

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)

**Etablierung neuer Strategien zur beschleunigten und verbesserten Inoskulation von in situ prävasikularisierten Gewebekonstrukten**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2011

vorgelegt von Haider Mussawy  
geboren am 13.06.1984 in Berlin

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Summary.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Einleitung.....</b>	<b>6</b>
<b>4. Ziel der Studie .....</b>	<b>11</b>
<b>5. Material und Methodik .....</b>	<b>12</b>
<b>5.1. Versuchstiere.....</b>	<b>12</b>
<b>5.2. Modell .....</b>	<b>12</b>
5.2.1. Herstellung der Scaffolds.....	12
5.2.2. Generierung prävasikularisierter Gewebekonstrukte.....	13
5.2.3. Kultivierung prävasikularisierter Gewebekonstrukte .....	14
5.2.4. Modell der Rückenhautkammer.....	16
5.2.5. Implantation der Rückenhautkammer .....	16
5.2.6. Implantation der Gewebekonstrukte in die Rückenhautkammer.....	19
<b>5.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>19</b>
5.3.1. Mikrozirkulatorische Parameter .....	20
5.3.1.1. Perfundierte ROIs .....	20
5.3.1.2. Funktionelle Kapillardichte .....	21
5.3.1.3. Gefäßdurchmesser .....	21
5.3.1.4. Blutzellgeschwindigkeit.....	22
5.3.1.5. Blutvolumenfluss.....	22
5.3.1.6. Scherrate .....	22
<b>5.4. Histologie und Immunhistochemie .....</b>	<b>23</b>
5.4.1. Histologische Präparate.....	23
5.4.2. Apoptose .....	23
5.4.3. CD31- $\alpha$ -SMA-Doppelfluoreszenzfärbung .....	24
5.4.4. CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung .....	24

5.4.5. Auswertung der Färbungen .....	24
<b>5.5. Experimentelles Protokoll.....</b>	<b>25</b>
5.5.1. Versuchsablauf.....	25
5.5.2. Versuchsgruppen.....	25
<b>5.6. Statistik.....</b>	<b>27</b>
<b>6. Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
<b>6.1. Mikrozirkulation der Rückenhautkammer .....</b>	<b>28</b>
<b>6.2. Inoskulation von Gewebekonstrukten nach in situ</b>	
<b>Prävaskularisierung und Kultivierung in DMEM.....</b>	<b>28</b>
6.2.1. Gefäßnetzwerke der Gewebekonstrukte .....	28
6.2.2. Apoptotische Zellen in den Gewebekonstrukten.....	30
6.2.3. Vaskularisierung implantierter Gewebekonstrukte.....	31
6.2.4. Mikrohämodynamische Parameter implantierter Gewebekonstrukte.....	33
6.2.5. Inoskulation und Inkorporation implantierter Gewebekonstrukte .....	33
<b>6.3. Inoskulation von Gewebekonstrukten nach in situ</b>	
<b>Prävaskularisierung und Einbettung in Matrigel .....</b>	<b>39</b>
6.3.1. Angiogene Stimulation prävaskularisierter Gewebekonstrukte.....	39
6.3.2. Vaskularisierung implantierter Gewebekonstrukte.....	39
6.3.3. Mikrohämodynamische Parameter implantierter Gewebekonstrukte.....	41
6.3.4. Inoskulation implantierter Gewebekonstrukte .....	43
<b>6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
<b>7. Diskussion .....</b>	<b>47</b>
<b>7.1. Diskussion von Material und Methodik .....</b>	<b>47</b>
7.1.1. Diskussion des Modells .....	47
7.1.2. Diskussion der Untersuchungstechniken.....	48
<b>7.2. Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
7.2.1. Inoskulation von Gewebekonstrukten nach in situ	
Prävaskularisierung und Kultivierung in DMEM.....	50
7.2.2. Inoskulation von Gewebekonstrukten nach in situ	
Prävaskularisierung und Einbettung in Matrigel.....	52
<b>7.3. Schlussfolgerung .....</b>	<b>54</b>

<b>8. Literatur .....</b>	<b>55</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>62</b>
<b>10. Publikationen.....</b>	<b>63</b>

# 1. Zusammenfassung

Beim Tissue Engineering werden lebende Zellen auf speziellen Trägermaterialien, die man als Scaffolds bezeichnet, angesiedelt und anschließend als Gewebekonstrukte in den Defekt eines Empfängers implantiert. Für den klinischen Erfolg des Tissue Engineerings ist neben einer entzündungsarmen Inkorporation die rasche Vaskularisierung der implantierten Gewebekonstrukte von entscheidender Bedeutung. Derzeit stellt die unzureichende Blutversorgung nach der Implantation der Konstrukte jedoch einen wesentlichen limitierenden Faktor beim Tissue Engineering dar.

Als mögliche Lösung dieses Problems können Scaffolds vor Implantation in einen Empfänger prävasikularisiert werden, so dass die präformierten Gefäße nach Implantation über den Prozess der Inoskulation einen Anschluss an die Blutgefäße des Empfängers herstellen. Zur Generierung von Blutgefäßen in Scaffolds können diese mit Stammzellen oder endothelialen Vorläuferzellen besiedelt werden, die das Potential besitzen, sich in Gefäße zu differenzieren. Alternativ kann der menschliche Körper als natürlicher Bioreaktor zur Gefäßneubildung genutzt werden. Zur Prüfung der Hypothese, dass eine Prävasikularisierung die Blutversorgung von Gewebekonstrukten nach Implantation in einen Empfänger beschleunigen kann, wurden in der vorliegenden Arbeit Scaffolds in situ prävasikularisiert. Hierzu dienten Hydroxylapatit-beschichtete Polyurethan-Scaffolds, die für 20 Tage in die Flanke von transgenen FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäusen implantiert wurden, um so das Einwachsen GFP (grün fluoreszierendes Protein)-positiver Blutgefäße aus dem umliegenden Gewebe zu ermöglichen. Nach 20 Tagen erfolgte die Entnahme der prävasikularisierten Gewebekonstrukte, die anschließend in die Rückenhautkammer von GFP-negativen Wildtyp FVB/N Mäusen implantiert wurden, um den Prozess der Inoskulation präformierter Blutgefäße mit den Gefäßen des Empfängers mit Hilfe intravitaler Fluoreszenzmikroskopie sowie histologischen und immunhistochemischen Verfahren untersuchen zu können.

Im ersten Studienabschnitt wurde analysiert, ob eine Kultivierung in situ prävasikularisierter Gewebekonstrukte durch Reduktion perivaskulärer Zellen zu einer beschleunigten Inoskulation führt. Hierzu wurden die prävasikularisierten Gewebekonstrukte

nach ihrer Entnahme aus der Flanke der Spendermäuse für 3 bzw. 10 Tage kultiviert, bevor sie anschließend in die Rückenhautkammer von Empfängertieren implantiert wurden. Nicht-kultivierte, prävasikularisierte Gewebekonstrukte dienten als Kontrolle. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung im Vergleich zu Kontrollen zu einer erniedrigten Anzahl  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)-positiver präformierter Blutgefäße in den Gewebekonstrukten führte. Nach der dreitägigen Kultivierung waren nahezu alle Zellen in den Gewebekonstrukten vital, wohingegen die Konstrukte, welche für 10 Tage kultiviert wurden, durch eine massiv erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen gekennzeichnet waren. Nach der Implantation in die Rückenhautkammer zeigten die für 3 Tage kultivierten Gewebekonstrukte eine verbesserte Vaskularisierung mit einer erhöhten funktionellen Kapillardichte und einer gesteigerten Perfusion.

Die immunhistochemische Detektion GFP-negativer Blutgefäße im Zentrum der Konstrukte und die Detektion GFP-positiver Blutgefäße im umliegenden Empfängergerewe zeigte weiterhin, dass es sowohl im Implantat (interne Inoskulation) als auch im umliegenden Gewebe (externe Inoskulation) zu einer Verbindung der präformierten Blutgefäße mit den Gefäßen des Empfängers kam. Zusammenfassend konnte somit im ersten Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Inoskulation von in situ prävasikularisierten Gewebekonstrukten durch die Destabilisierung der Gefäßwände präformierter Blutgefäße während einer Kurzzeit-Kultivierung beschleunigt werden kann.

Im zweiten Studienabschnitt wurde untersucht, ob der Prozess der Inoskulation durch eine Präkultivierung der in situ prävasikularisierten Gewebekonstrukte in einer pro-angiogenen extrazellulären Matrix beschleunigt werden kann. Hierzu wurden prävasikularisierte Konstrukte für 30min in Matrigel eingebettet oder für 3 Tage in der Matrix kultiviert und anschließend in die Rückenhautkammer von Empfängertieren implantiert. Matrigel-freie Gewebekonstrukte dienten als Kontrolle. Die Präkultivierung führte zu einem Ausprossen von CD31/GFP-positiven Gefäßen aus den Konstrukten in das umgebende Matrigel. Nach der anschließenden Implantation dieser Gewebekonstrukte in die Rückenhautkammern zeigte sich im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen eine deutlich verbesserte Vaskularisierung mit einer signifikanten Erhöhung der funktionellen Kapillardichte zwischen dem 6. und 14. Untersuchungstag. Zeitgleich kam es zu einer Zunahme GFP-positiver Blutgefäße in dem

das Konstrukt umgebenden Gewebe. Es kann daher geschlußfolgert werden, dass die Vaskularisierung prävaskularisierter Gewebekonstrukte durch Präkultivierung in einer pro-angiogenen Matrix verbessert werden kann und dieser Effekt vor allem auf einer gesteigerten externen Inoskulation im umliegenden Empfängergewebe beruht.

## 2. Summary

In tissue engineering, living cells are seeded on three-dimensional scaffolds and subsequently implanted as tissue constructs into a host defect site. The survival and function of these tissue constructs crucially depends on a rapid and adequate vascularization after their implantation. Until now, the ideal tissue construct, which sufficiently establishes an adequate blood supply within the first days after implantation, has not been found. The engineering of preformed microvessels within tissue constructs before implantation represents a promising strategy to rapidly vascularize implanted tissue constructs by the process of inosculation.

In the first part of this thesis it was analyzed, whether cultivation of in situ prevascularized tissue constructs promotes inosculation by reducing the perivascular cell coverage of preformed microvessels. For this purpose, nano-size hydroxyapatite particles/poly(ester-urethane) scaffolds were implanted for 20 days into the flank of FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato mice to allow the ingrowth of a granulation tissue with green fluorescent protein (GFP)-positive blood vessels. These in situ generated prevascularized tissue constructs were then cultivated for 3 or 10 days before implantation into the dorsal skinfold chamber of wild-type FVB/N mice with GFP-negative blood vessels. Inosculation, vascularization and blood perfusion of the implants were analyzed by means of intravital fluorescence microscopy and immunohistochemistry. Non-cultivated scaffolds served as controls. Cultivation of the constructs resulted in the loss of the perivascular  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)-positive cell coverage. After 3 days of cultivation, the tissue constructs still exhibited an appropriate cell viability, whereas in the 10 days-cultivated group apoptotic cell death was massively increased. After implantation into the dorsal skinfold chamber, inosculation of preformed microvessels was accelerated in the 3 days-cultivated group. These tissue constructs showed an improved vascularization. Immunohistochemical detection of GFP-positive microvessels in the granulation tissue around the implants and GFP-negative blood vessels in the center of the tissue constructs further revealed that internal and external inosculation occurred in parallel.



Taken together, the first part of this thesis demonstrated that short-term cultivation of in situ prevascularized tissue constructs accelerates inosculation of their microvascular networks with the host microvasculature due to the destabilization of preformed microvessels.

In the second part of this thesis it was analyzed, whether the in vitro outgrowth of vascular sprouts from preformed microvessels into a pro-angiogenic extracellular matrix may promote external inosculation of prevascularized tissue constructs after implantation into the host and, thus, accelerate the restoration of blood perfusion in the implants. For this purpose, in situ generated prevascularized tissue constructs were pre-cultivated for 3 days in Matrigel before implantation. In another group the constructs were implanted into the dorsal skinfold chamber 30min after embedding in Matrigel. Matrigel-free constructs served as controls. Cultivation of constructs in Matrigel for 3 days resulted in an in vitro outgrowth of CD31/GFP-positive vascular sprouts. After implantation into the dorsal skinfold chamber these constructs exhibited a markedly improved vascularization when compared to the other two groups. This was associated with an increased number of GFP-positive blood vessels growing into the surrounding host tissue. Accordingly, the second part of this thesis showed that the establishment of a blood supply to prevascularized tissue constructs can be accelerated by their pre-cultivation in a pro-angiogenic extracellular matrix, promoting external inosculation of the preformed microvascular networks after implantation into the host tissue.

### 3. Einleitung

Zu den größten Herausforderungen der modernen Medizin zählt der Ersatz oder die Wiederherstellung von Zell-, Gewebe- und Organfunktionen. Therapieverfahren wie die Organtransplantation oder die Versorgung mit Implantaten können heute für viele Patienten eine Verbesserung der Lebensqualität oder auch die Steigerung der Lebenserwartung ermöglichen. Bis heute werden angeborene, traumatisch oder tumors bedingte Substanzdefekte im Gewebe mit Fremdmaterialien oder körpereigenem Spendermaterial rekonstruiert. Im Körper dauerhaft verbleibende Implantate aus körperfremden Materialien können zu Fremdkörperreaktionen führen und bergen ein stetiges Infektionsrisiko. Das optimale Ersatzgewebe stammt daher aufgrund seiner immunologischen Unbedenklichkeit vom Patienten selbst.

Den Forschungszweig, der sich mit der Herstellung von Ersatzgewebe beschäftigt, bezeichnet man als Tissue Engineering. Dieser Begriff wurde erstmals 1987 von der National Science Foundation (USA) definiert. Beim klassischen Ansatz des Tissue Engineerings werden Zellen aus dem Patienten isoliert und außerhalb des Organismus vermehrt. Die Zellen werden dann auf einem Biomaterial (Scaffold) angesiedelt, das den Zellen als dreidimensionale Matrix dient. Das mit den Zellen besiedelte Scaffold bezeichnet man auch als Gewebekonstrukt. Dieses Gewebekonstrukt wird anschließend in den Gewebedefekt eines Empfängers implantiert.

Scaffolds für das Tissue Engineering können aus verschiedenen Materialien bestehen. Neben natürlichen Biomaterialien wie Kollagen [FREYMAN et al., 2001] oder Alginat [MARIJNISSEN et al., 2002] kommen auch synthetische Materialien wie Polylactic-co-Glycolid (PLGA) [DRUECKE et al., 2004], Hydrogel [HOLLAND et al., 2005], Keramiken und Metalle [DUCHEYNE und QIU, 1999; MASTROGIACOMO et al., 2005] zum Einsatz. Die verschiedenen Trägermaterialien müssen mechanisch stabil sein und geben in der Regel die Form und Struktur des herzustellenden Gewebes oder Organs vor. Idealerweise besteht ein Scaffold aus einem resorbierbaren Material, so dass es nach Implantation in einen Gewebedefekt schließlich vollständig von dem gewünschten Gewebe ersetzt wird [AGRAWAL und Ray, 2000]. Die Abbau-

produkte eines Scaffolds dürfen hierbei nicht toxisch sein und sollten beim Patienten keine immunologischen Reaktionen hervorrufen.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für den Erfolg des Tissue Engineerings stellt die Blutversorgung der Gewebekonstrukte nach Implantation in das Empfängergewebe dar. Bleibt die Vaskularisierung der Konstrukte aus, so sterben die Zellen darin ab. Dünne Gewebe mit geringen metabolischen Anforderungen können nach der Implantation durch Sauerstoffdiffusion versorgt werden. Dabei beträgt die maximale Sauerstoffdiffusionsstrecke von einem Blutgefäß zu den zu versorgenden Zellen ca. 150-200µm [FOLKMAN und HOCHBERG, 1973; COLTON, 1995]. Zu diesen einfachen Geweben zählen Haut und Knorpel, die gegenwärtig für den klinischen Gebrauch bereits gezüchtet werden können [VACANTI und UPTON, 1994; KREMER et al., 2000]. Größere dreidimensionale Gewebekonstrukte können nicht ausschließlich per diffusionem versorgt werden. Sie sind zusätzlich auf die Ausbildung eines eigenen Blutgefäßsystems zum dauerhaften Überleben angewiesen [BORGES et al., 2004; YARLAGADDA et al., 2005]. Aus diesem Grund ist die Konstruktion von Knochen- [SALGADO et al., 2004], Muskel- [DEASY et al., 2004], Nerven- [LUNDBORG, 2004] oder Lebergewebe [JIANG et al., 2004; OHASHI et al., 2005] wesentlich schwieriger.

Zur Verbesserung der Vaskularisierung von implantierten Gewebekonstrukten wurden in den letzten Jahren viele Strategien erprobt. Hierzu zählt die Modifikation der chemischen Zusammensetzung von Scaffolds [SUNG et al., 2004; Rücker et al., 2006]. Weiterhin kann die Blutgefäßbildung mittels Inkorporation unterschiedlicher Wachstumsfaktoren stimuliert werden [PERETS et al., 2003; ENNETT et al., 2006; NILLESEN et al., 2007]. Außerdem ist es möglich, Scaffolds mit pro-angiogenen extrazellulären Matrices zu beschichten [LASCHKE et al., 2008]. Des Weiteren werden Scaffolds mit Stammzellen oder endothelialen Vorläuferzellen besiedelt, welche das Potential besitzen, sich in Gefäße zu differenzieren [SHEPHERD et al., 2006; LEES et al., 2007; SMILER et al., 2007]. Auch die Architektur der Scaffolds kann optimiert werden. Dabei ist beispielsweise die Porengröße sowie der offene Kontakt der Porenräume in den Scaffolds für eine gute Vaskularisierung von großer Bedeutung. So konnten DRUECKE et al. [2004] bereits zeigen, dass eine Porengröße von 250-300µm optimale Voraussetzungen für das Einwachsen von Gefäßen in Scaffolds

schaft. All diese Strategien sollen über den Prozess der Angiogenese das Einwachsen von Blutgefäßen des Empfängers in die implantierten Gewebekonstrukte fördern.

Die Angiogenese ist definiert als Bildung neuer Gefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen. Es handelt sich dabei um einen komplexen, dynamischen Prozess, an dem verschiedene Zelltypen und regulatorische Mechanismen beteiligt sind. Dieser Prozess beginnt mit der angiogenen Stimulation von Endothelzellen. Durch die Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen aus den Endothelzellen kommt es zum Abbau der umliegenden Basalmembran und infolge dessen zu einer Vasodilatation des entsprechenden Gefäßes. Anschließend migrieren die Endothelzellen in das Interstitium und es bilden sich Gefäßsprossen. Weitere Endothelzellen folgen den migrierenden Zellen und proliferieren, so dass sich das neu ausgebildete Gefäß verlängert. Um die Stabilität der neugebildeten Gefäßwand zu gewährleisten, sind weitere Zelltypen notwendig. Hierzu zählen glatte Muskelzellen, Perizyten und Fibroblasten. Des Weiteren wird die Produktion von extrazellulärem Bindegewebe benötigt. Die einzelnen Schritte der Angiogenese werden unter anderem durch Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert [PATAN, 2004]. Zu diesen Wachstumsfaktoren gehören platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) und fibroblast growth factor (FGF)-1 und FGF-2 [NORRBY, 1997].

Die physiologische Wachstumsgeschwindigkeit von Blutgefäßen beträgt ca. 5µm pro Stunde [ZAREM, 1969; ORR et al., 2003]. Deswegen nimmt die vollständige Vaskularisierung implantierter Gewebekonstrukte über den Prozess der Angiogenese so viel Zeit in Anspruch, dass ein Zelluntergang im Zentrum der Implantate nicht verhindert werden kann. Entsprechend ist es trotz der bereits beschriebenen Vaskularisierungsstrategien bisher noch nicht gelungen, eine ausreichende Blutversorgung von dreidimensionalen Gewebekonstrukten in den ersten Tagen nach Implantation zu gewährleisten [LASCHKE et al., 2006].

Eine vielversprechende Alternative könnte es sein, Scaffolds vor der Implantation bereits zu prävasikularisieren. Dies kann in vitro durch die Besiedlung mit Stammzellen oder Endothelzellen erfolgen [KOIKE et al., 2004; LOKMIC und MITCHELL, 2008]. Alternativ kann der menschliche Körper als natürlicher Bioreaktor zur Gefäßneubildung in Gewebekonstrukten genutzt werden [SOLTYSIK und SAXENA, 2009;

KOKEMULLER et al., 2010]. Die prävascularisierten Gewebekonstrukte können nach der Implantation einen Anschluss an die Blutgefäße des Empfängers herstellen. Dies bezeichnet man auch als Inoskulation. So soll eine schnelle Perfusion der präformierten Gefäße erreicht und damit eine möglichst frühe Versorgung der transplantierten Gewebekonstrukte erzielt werden. LASCHKE et al. [2008] konnten nachweisen, dass die präformierten Gefäße in den Gewebekonstrukten mit den Gefäßen des Empfängers anastomosieren und dadurch eine Perfusion der präformierten Blutgefäße erfolgt. Dabei wird zwischen einer internen und einer externen Inoskulation unterschieden. Interne Inoskulation bedeutet, dass Blutgefäße des Empfängers in das Gewebekonstrukt einwachsen und im Inneren Anschlüsse an die präformierten Gefäße ausbilden. Externe Inoskulation beschreibt dagegen das Auswachsen präformierter Gefäße in das umliegende Empfängergewebe, wo sie einen Anschluss an die Empfängergefäße herstellen [LASCHKE et al., 2010]. Die Reperfusion präformierter Blutgefäße in den Gewebekonstrukten erfolgt jedoch nicht in den ersten 3 bis 6 Tagen [LASCHKE et al., 2008], so dass ein Zelluntergang in den implantierten Gewebekonstrukten nicht verhindert werden kann. Es müssen daher neue Strategien zur beschleunigten und verbesserten Inoskulation prävascularisierter Gewebekonstrukte etabliert werden. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Ansätze zur Verbesserung der Inoskulation untersucht.

SHEPHERD et al. [2004] konnten nachweisen, dass die Kultivierung reifer Gefäßnetzwerke für wenige Tage zu einem Verlust perivaskulärer glatter Muskelzellen führt. Durch den Verlust dieser Zellen wird die Migration von Endothelzellen erleichtert. Die Migration stellt wiederum einen wichtigen Schritt im Prozess der Angiogenese dar, wodurch es zu einer beschleunigten Anastomosierung der kultivierten präformierten Gefäße im Gewebekonstrukt nach Implantation mit den Gefäßen des Empfängers kommen könnte. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit Hydroxylapatit-beschichtete Polyurethan-Scaffolds für 20 Tage in die Flanke von FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäusen implantiert, um das Einwachsen von Blutgefäßen aus dem umliegenden Empfängergewebe in die Scaffolds zu ermöglichen und somit prävascularisierte Gewebekonstrukte zu schaffen. Anschließend wurden diese Gewebekonstrukte vorsichtig exzidiert und für 3 bzw. 10 Tage kultiviert, bevor sie in die Rückenhautkammer von Wildtyp FVB/N Mäusen implantiert wurden. Als Kontrolle dienten nicht-kultivierte, prävascularisierte

Gewebekonstrukte, die direkt von der Flanke der FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäuse in die Rückenhautkammer implantiert wurden.

Im zweiten Studienabschnitt wurden die prävascularisierten Gewebekonstrukte in Matrigel eingebettet. Matrigel setzt sich aus einer Kombination verschiedener pro-angiogener Wachstumsfaktoren zusammen, die die Entstehung von Blutgefäßen stimulieren. Durch Präkultivierung der prävascularisierten Gewebekonstrukte in Matrigel kam es während des Kultivierungszeitraums zu einem Aussprossen gefäßähnlicher Strukturen in das Matrigel. Daher sollte die Hypothese geprüft werden, ob diese Gefäßsprossen nach Implantation in die Rückenhautkammer von Empfängertieren über den Prozess der Inoskulation eine raschere Blutversorgung der implantierten Gewebekonstrukte herstellen können. Hierzu wurden in situ prävascularisierte Gewebekonstrukte für 30 min bzw. 3 Tage im Matrigel eingebettet. Anschließend erfolgte die Implantation der präkultivierten Gewebekonstrukte in die Rückenhautkammer. Als Kontrolle dienten Matrigel-freie Gewebekonstrukte, die direkt aus der Flanke von FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäusen in die Rückenhautkammern von Empfängertieren implantiert wurden.

Die Rückenhautkammer stellt ein etabliertes Modell dar, bei dem unter Verwendung der Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen in vivo qualitativ und quantitativ die Ausbildung neuer Blutgefäße bzw. die Reperfusion präformierter Blutgefäße nachgewiesen und beurteilt werden kann. Dabei werden mikrozirkulatorische Parameter wie funktionelle Kapillardichte, Blutzellgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser in den Implantaten erfasst.

Histologische und immunhistochemische Untersuchungen geben zusätzlich Aufschluss über die Inkorporation und Inoskulation der implantierten Gewebekonstrukte im Empfängergewebe.

## 4. Ziel der Studie

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Strategien zur beschleunigten und verbesserten Inoskulation von in situ prävasikularisierten Gewebekonstrukten untersucht. Dafür wurden im ersten Studienabschnitt Hydroxylapatit-beschichtete Polyurethan-Scaffolds in die Flanke von FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäusen implantiert, um das Einwachsen von Blutgefäßen in die Scaffolds zu ermöglichen. Im Anschluss daran wurden die so entstandenen Gewebekonstrukte vorsichtig exzidiert und für 3 bzw. 10 Tage kultiviert, bevor sie in die Rückenhautkammern von Wildtyp FVB/N Mäusen implantiert wurden. Auf diese Weise sollte die Hypothese geprüft werden, ob die Kultivierung der in situ prävasikularisierten Gewebekonstrukte zu einer beschleunigten Inoskulation nach Implantation in das Empfängergewebe führt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden prävasikularisierte Gewebekonstrukte in der pro-angiogenen extrazellulären Matrix Matrigel eingebettet und kultiviert, bevor sie in die Rückenhautkammern implantiert wurden. Während der Kultivierung der prävasikularisierten Gewebekonstrukte in Matrigel kam es zur Ausbildung von Gefäßsprossen. Es sollte die Hypothese geprüft werden, ob diese Gefäßsprossen nach Implantation in die Rückenhautkammer von Empfängertieren über den Prozess der Inoskulation eine raschere Blutversorgung der implantierten Gewebekonstrukte herstellen können. Dabei wurde auf die folgenden Fragen näher eingegangen:

1. Kann die Kultivierung eines in situ prävasikularisierten Gewebekonstrukts vor Implantation zu einer beschleunigten Durchblutung nach Implantation in den Empfänger führen?
2. Wie lange sollten prävasikularisierte Gewebekonstrukte kultiviert werden und zu welchen morphologischen Veränderungen führt eine solche Kultivierung in den Konstrukten?
3. Welche Auswirkungen hat die Präkultivierung prävasikularisierter Gewebekonstrukte in Matrigel auf die präformierten Gefäße?
4. Führt die Präkultivierung prävasikularisierter Gewebekonstrukte in Matrigel zu einer verbesserten Durchblutung der Konstrukte nach Implantation in den Empfänger

## **5. Material und Methodik**

### **5.1. Versuchstiere**

Sämtliche Untersuchungen wurden an FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäusen (Jackson Labor, Maine, USA) und Wildtyp FVB/N Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 22-26g durchgeführt. Während der Versuche wurden alle Tiere in einem klimatisierten Raum (Temperatur: 22°C) bei zwölfstündigem Tag-/Nachtrhythmus und unter Bereitstellung von Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum in Einzelkäfigen gehalten. Die Versuche wurden gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz (Saarbrücken) genehmigt.

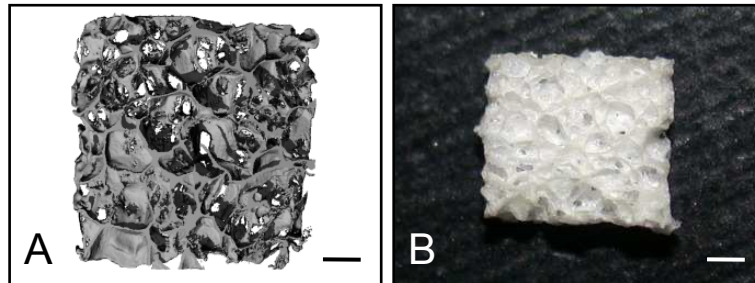
### **5.2. Modell**

#### **5.2.1. Herstellung der Scaffolds**

Für sämtliche Versuche wurden biologisch abbaubare Hydroxylapatit-beschichtete Polyurethan-Scaffolds verwendet. Diese wurden mit Hilfe der sogenannten Salz-Auswasch-Umkehr-Methode hergestellt [GORNA et al., 2006; BOISSARD et al., 2009]. Hierbei werden Salzkristalle mit einer organischen Polymerlösung gemischt. Die organische Polymerlösung setzt sich aus Hydroxylapatit-Nanopartikeln und Polyurethan zusammen. Bei Raumtemperatur findet für 24 Stunden die mechanische Durchmischung dieser Lösung statt. Anschließend wird das Lösungsmittel entzogen, so dass ein Gemisch aus festem Polymer und Salzkristallen entsteht. Nun wird das Salz ausgewaschen und es entsteht ein Scaffold, dessen Porosität sich durch den Salzgehalt des Gemisches einstellen lässt. Die für die vorliegende Arbeit produzierten Scaffolds waren initial ca. 2 x 9cm groß und wurden dann auf eine Größe von 3 x 3 x 1mm (*Abbildung 1A und B*) geschnitten, um sie in die Rückenhautkammer implantieren zu können.



LASCHKE et al. [2009] konnten kürzlich in einer Studie nachweisen, dass diese Scaffolds eine gute Biokompatibilität besitzen, keine zytotoxischen Bestandteile enthalten und nur eine geringe Leukozytenaktivierung nach Implantation hervorrufen.

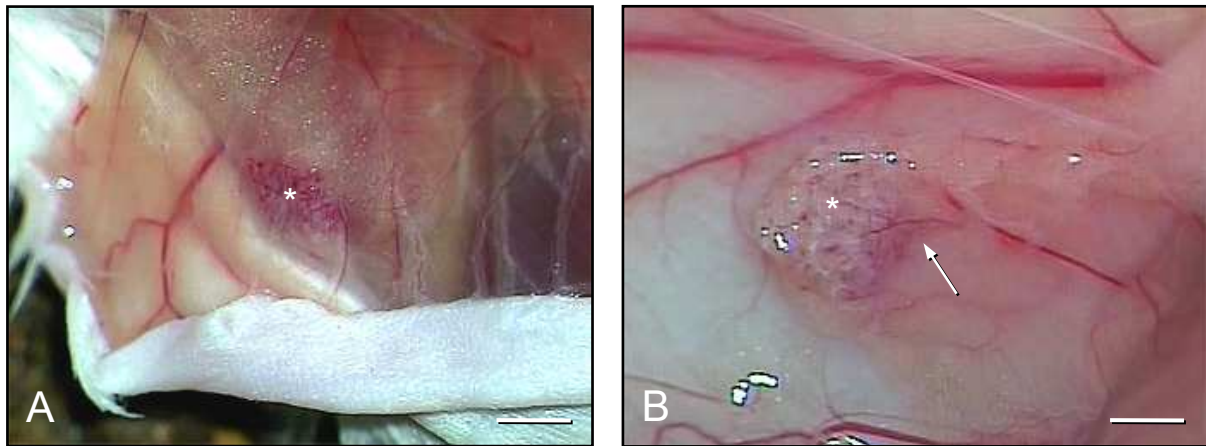


**Abbildung 1:** **A:** Computertomographische Rekonstruktion eines Hydroxylapatit-beschichteten Polyurethan-Scaffolds. **B:** Operationsmikroskopische Aufnahme des Scaffolds. Auf beiden Abbildungen ist die poröse Struktur des Scaffolds zu erkennen, die das Einwachsen neuer Blutgefäße ermöglicht (Maßstab: A = 600µm; B = 800µm).

### 5.2.2. Generierung prävascularisierter Gewebekonstrukte

Zur Generierung prävascularisierter Gewebekonstrukte wurden die Hydroxylapatit-beschichteten Polyurethan-Scaffolds für 20 Tage in die Flanken von 12-16 Wochen alten FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäusen implantiert. Diese Tiere exprimieren grün fluoreszierendes Protein (GFP) unter der Kontrolle des Tie2-Promoters [MOTOIKE et al., 2000]. Bei Tie2 handelt es sich um eine gefäßspezifische endotheliale Tyrosinkinase [LOUGHNA und SATO, 2001]. Entsprechend waren alle neugebildeten Gefäße in den Gewebekonstrukten GFP-positiv.

Zur Implantation der Scaffolds in die Flanke wurde das Versuchstier durch eine intra-peritoneale (i. p.) Injektion von Ketaminhydrochlorid (75mg/kg Körpergewicht [KG], Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) sowie Xylazinhydrochlorid 2% (75mg/kg KG, Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) anästhesiert. Im Anschluss daran wurden jeweils zwei subkutane Taschen in die linke und rechte Flanke des Versuchstieres präpariert. Pro Tasche wurde vorsichtig ein Scaffold eingesetzt und der Hautschnitt anschließend mit einer Einzelknopfnahse wieder verschlossen. Nach 20 Tagen war das Scaffold von neugebildeten, GFP-positiven Gefäßen durchsetzt, die vom umliegenden Gewebe des Empfängertieres eingewachsen waren (*Abbildung 2A und B*). Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die vorsichtige Entnahme der entstandenen Gewebekonstrukte zur Implantation in die Rückenhautkammer.



**Abbildung 2: A, B:** Operationsmikroskopische Aufnahmen eines Hydroxylapatit-beschichteten Polyurethan-Scaffolds am Tag 20 nach Implantation in die Flanke einer FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Maus. Blutgefäße des Empfängers (B, Pfeil) sind in das Scaffold (Sternchen) eingewachsen und bilden ein neues, dichtes Gefäßnetzwerk aus (Maßstab: A = 2,5mm; B = 1,7mm).

### 5.2.3. Kultivierung prävascularisierter Gewebekonstrukte

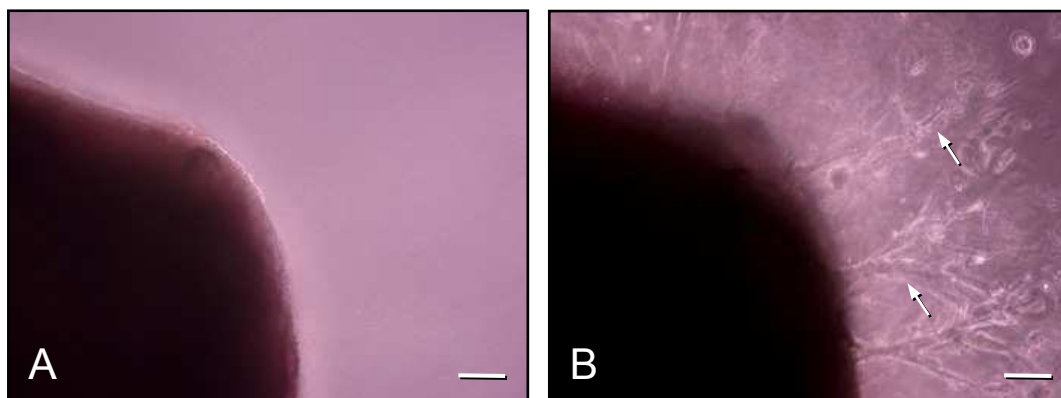
Nachdem die prävascularisierten Gewebekonstrukte aus den FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäusen exzidiert wurden, fand eine Aufteilung in verschiedene Versuchsreihen statt. In der ersten Versuchsreihe wurden die prävascularisierten Gewebekonstrukte für 3 oder 10 Tage in 37°C warmen Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; 10% fetales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin; PAA, Cölbe, Deutschland) kultiviert und anschließend in die Rückenhautkammer von Empfängertieren implantiert.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die prävascularisierten Gewebekonstrukte in 200µl Matrigel (BD Matrigel TM Matrix; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) eingebettet. Matrigel ist eine extrazelluläre Matrix, die aus verschiedenen Komponenten besteht. Die enthaltenen Membranproteine werden aus dem „Engelbreth-Holm-Swarm“ (EHS) Maus-Sarkom extrahiert. Sie setzen sich hauptsächlich aus Laminin, Kollagen Typ 4, Entactin (Nidogen) und Heparansulfatproteoglykanen zusammen. Weiterhin sind in Matrigel Wachstumsfaktoren wie insulin-like growth factor (IGF), epidermal growth factor (EGF), VEGF, FGF und transforming growth factor (TGF)-β enthalten. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Matrigel die Angiogenese in vitro [KUBOTA et al., 1988; MAESHIMA et al., 2001] und in vivo [PASSANITI et al., 1992; ISAJI et al., 1997; KISUCKA et al., 2006] stimuliert. Matrigel wurde bei ca. 4°C

in Plastikkuvetten auf Eis gelagert. Bei dieser Temperatur liegt Matrigel in flüssiger Form vor. Zur Beschichtung der prävascularisierten Gewebekonstrukte mit Matrigel wurden diese zusammen mit der extrazellulären Matrix in eine Petrischale gefüllt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, so dass sich ein dreidimensionales Gel um die Konstrukte ausbildete. Nach einer halben Stunde wurde die Petrischale mit 2ml 37°C warmem DMEM gefüllt und die eingebetteten Gewebekonstrukte für 3 Tage im Brutschrank kultiviert. Während der dreitägigen Kultivierung der prävascularisierten Gewebekonstrukte in Matrigel kam es zur Ausbildung von Gefäßsprossen (*Abbildung 3A und B*), die aus den Konstrukten in das umliegende Gel auswuchsen. Nach dieser Zeit wurden die Gewebekonstrukte vorsichtig en bloc mit einem Skalpell aus dem Matrigel herausgeschnitten. Dabei wurde ein schmaler Randsaum erhalten, in dem sich die Gefäßsprossen befanden. Die Gewebekonstrukte wurden dann in die Rückenhautkammer von Wildtyp FVB/N Mäusen implantiert.

In einer zweiten Gruppe wurden die prävascularisierten Gewebekonstrukte lediglich für 30min in Matrigel eingebettet und anschließend direkt in die Rückenhautkammer der Empfängertiere implantiert.

In beiden Versuchsreihen dienten prävascularisierte Gewebekonstrukte, die direkt aus der Flanke von FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäusen in die Rückenhautkammer von Wildtyp FVB/N Mäusen eingesetzt wurden, als Kontrolle.



**Abbildung 3:** **A:** Mikroskopische Aufnahme des Randbereiches eines prävascularisierten Gewebekonstrukts direkt nach der Einbettung in Matrigel. **B:** Randbereich des Konstrukts nach dreitägiger Kultivierung in Matrigel. Zu diesem Zeitpunkt sind Gefäßsprossen (**B**, Pfeile) aus dem Konstrukt in das umliegende Matrigel eingewachsen (Maßstab: A, B = 100µm).

### 5.2.4. Modell der Rückenhautkammer

Die Rückenhautkammer (*Abbildung 4*) wird seit vielen Jahren als Modell für standardisierte in vivo Untersuchungen zur Angiogenese genutzt. Die erstmals von ALGIRE et al. [1943] beschriebene Rückenhautpräparation ermöglicht die intravitalfluoreszenzmikroskopische Untersuchung mikrozirkulatorischer Parameter am wachen Versuchstier. Durch die intravenöse Gabe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe kann dabei die gesamte Mikrozirkulation der freipräparierten Rückenhautmuskulatur als auch die Entwicklung bzw. Reperfusion von Blutgefäßen innerhalb der sich in der Rückenhautkammer befindlichen Implantate beurteilt werden.



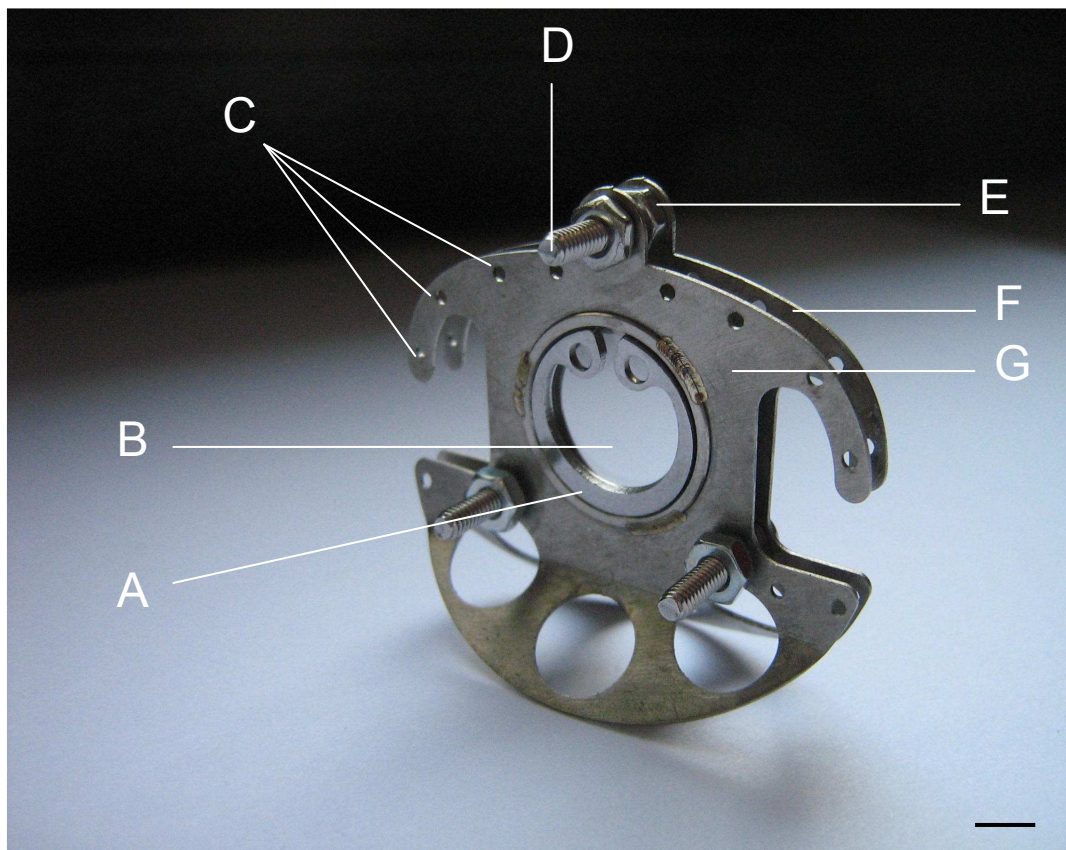
**Abbildung 4:** Wildtyp FVB/N Maus nach Implantation einer Rückenhautkammer. Im Beobachtungsfenster (Pfeil) sind die Blutgefäße des freipräparierten, quergestreiften Hautmuskels zu erkennen (Maßstab = 7mm).

### 5.2.5. Implantation der Rückenhautkammer

Zur Präparation der Rückenhautkammer wurde das Versuchstier zunächst durch eine i. p. Injektion Ketaminhydrochlorid (75mg/kg KG, Pharmacia GmbH) sowie Xylazinhydrochlorid 2% (75mg/kg KG, Rompun, Bayer) narkotisiert. Anschließend konnte das Fell der Rückenhaut durch Elektrorasur (Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen) sowie nachfolgende chemische Depilation (Plica med Creme; Asid Bonz, Böblingen) entfernt werden. Die enthaarte Körperpartie wurde mit warmem Wasser gereinigt und mit 70%-igem Alkohol desinfiziert. Bevor die eigentliche Präparation begann, wurde das Versuchstier in Bauchlage positioniert, die elastische Rückenhautfalte angehoben und entlang ihrer Mittellinie mit zwei Haltefäden horizontal aufgespannt. Auf die-



se Weise war es unter Gegenlichtkontrolle möglich, die Rückseite der aus zwei symmetrischen Titanrahmen zusammengesetzten Rückenhautkammer (*Abbildung 5*) an ihrem Oberrand mit Nahtfäden kaudal der entlang der Schulterbasis verlaufenden Gefäße an der Hautfalte zu fixieren. Im basalen Bereich der Hautfalte wurden mit einer Präparierschere zwei kleine Inzisionen geschaffen, durch welche die beiden Schrauben des Kammerrahmens zur Vorderseite geführt werden konnten. Auf diese wurden zwei Klemmen gesetzt, um das Präparationsfeld unter Spannung zu halten.

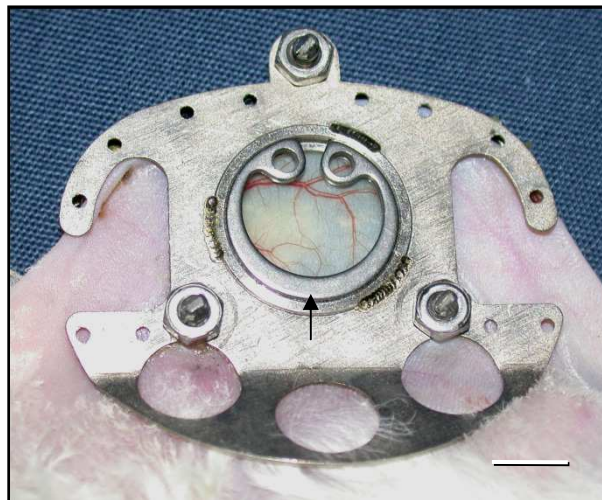


**Abbildung 5:** Perspektivische Ansicht einer Rückenhautkammer für die Maus, die sich aus zwei symmetrischen Titanrahmen zusammensetzt (Gewicht ~ 3g). A: Sprengring zur Fixierung des Deckglases; B: Beobachtungsfenster mit Deckglas; C: Bohrungen für Fixationsfäden; D: Verbindungsschraube; E: Schraubenmutter; F: Hinterer Titanrahmen; G: Vorderer Titanrahmen (Maßstab = 6mm).

In einem nächsten Schritt wurde erneut unter Gegenlichtkontrolle das abzutragende Gewebeareal im Bereich des späteren Beobachtungsfensters markiert, das einen Durchmesser von etwa 15mm aufwies. Dieser Durchmesser war größer als der Durchmesser des eigentlichen Beobachtungsfensters von 11mm. Auf diese Weise konnte eine Gewebekompression nach Anbringen des vorderseitigen Kammerrah-

mes vermieden und eine physiologische Blutversorgung des Gewebes in der Kammer gewährleistet werden. Für das weitere Vorgehen wurden die Haltefäden wieder entfernt und das Versuchstier in Seitenlage gebracht.

Unter Zuhilfenahme eines Stereo-Operationsmikroskops (Wild M 650; Leitz, Schweiz) konnten die dem Beobachtungsfenster zugewandte Kutis, Subkutis mit quergestreiftem Hautmuskel sowie die beiden Schichten des Retraktormuskels einschließlich subkutanem Fettgewebe entfernt werden. Die verbliebene Schicht, welche aus kontralateralem quergestreiftem Hautmuskel, Subkutangewebe und Haut bestand, wurde mehrmals mit steriler Elektrolytlösung gespült. Dann wurde der vordere Titanrahmen mit Stahlmuttern auf den Verbindungsschrauben in einem Abstand von 400-500µm zum hinteren Titanrahmen positioniert. Unter Vermeidung von Luft-einschlüssen konnte anschließend das Deckglas des Beobachtungsfensters durch Adhäsion an den freipräparierten Muskel aufgebracht und mit einem Sprengring im vorderen Titanrahmen fixiert werden (*Abbildung 6*).



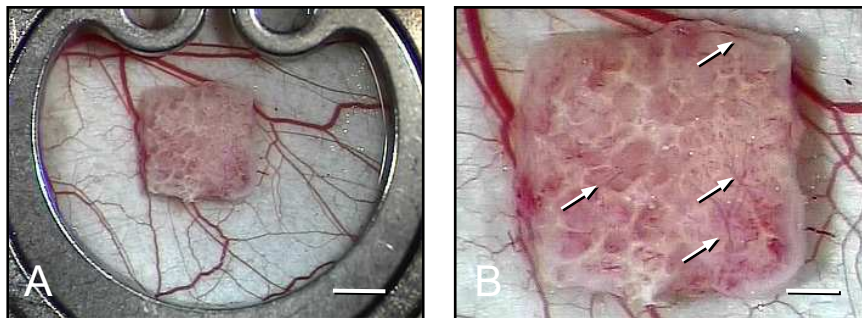
**Abbildung 6:** *Implantierte Rückenhautkammer mit Beobachtungsfenster. Ein Sprengring (Pfeil) fixiert das Deckglas im Kammerrahmen. Durch das Beobachtungsfenster können die Gefäße der Rückenhautkammerpräparation direkt eingesehen werden (Maßstab = 5,2mm).*

Somit war während des gesamten Versuches jederzeit der Zugang zum Beobachtungsfeld durch die Abnahme des Sprengrings und des Deckglases möglich.

Die Versuchstiere konnten sich mindestens 48 Stunden von Narkose und chirurgischem Trauma erholen, bevor die Rückenhautkammern zur Implantation der Gewebekonstrukte verwendet wurden.

### 5.2.6. Implantation der Gewebekonstrukte in die Rückhautkammer

Für die Implantation prävascularisierter Gewebekonstrukte in die Rückenhautkammer wurde das Versuchstier narkotisiert, auf einer speziell angefertigten Plexiglasbühne fixiert und der Sprengring sowie das Deckglas der Kammer entfernt. Nun wurde das Konstrukt im Zentrum des Beobachtungsfensters platziert (*Abbildung 7A und B*) und einige Tropfen 0,9%-iger NaCl-Lösung hinzugegeben, um beim erneuten Verschließen der Kammer mit einem neuen Deckglas Luft einschließen zu vermeiden.



**Abbildung 7: A, B:** Operationsmikroskopische Aufnahmen eines *in situ* prävascularisierten Gewebekonstrukts direkt nach der Entnahme aus einer FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Maus und anschließender Implantation in die Rückenhautkammer einer Wildtyp FVB/N Maus. Das Konstrukt ist mit einem eigenen präformierten Gefäßnetzwerk ausgestattet (B, Pfeile) (Maßstab: A = 1,5mm; B = 580  $\mu$ m).

### 5.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Vor jeder mikroskopischen Untersuchung wurde das Versuchstier narkotisiert und in Seitenlage auf einer speziellen Plexiglasbühne fixiert, so dass die Rückenhautkammer mit ihrem Beobachtungsfenster in waagrechter Lage unter das Mikroskop positioniert werden konnte. Daraufhin erfolgte die intravenöse Gabe von 0,1ml Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-Dextran 5% (Molekulargewicht 150.000 Da; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) durch retrobulbäre Injektion. Durch diesen Farbstoff wurde das Blutplasma angefärbt und die Gefäße konnten in Blaulicht-Epi-Illumination kontrastreich dargestellt werden. Zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurde ein modifiziertes Zeiss AxioTech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100W Quecksilber (HBO)-Dampflampe verwendet. Drei zwischengeschaltete Filterblöcke ermöglichten eine Anregung mit Licht der Wellenlänge von 330-390nm, 450-490nm und 530-560nm. Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden mit Hilfe einer CCD

(charge coupled device)-Videokamera (FK6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) auf eine DVD aufgenommen. Auf diese Weise konnten die mikroskopischen Bilder zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet werden. Mit Hilfe von 5x, 10x und 20x Objektiven mit langem Arbeitsabstand (Zeiss) konnten Vergrößerungen von x115, x230 und x460 auf einem 14-Zoll Videomonitor (KV-14CT1E, Sony, Tokio, Japan) erzielt werden.

### **5.3.1. Mikrozirkulatorische Parameter**

Durch die Aufzeichnung der mikroskopischen Bilder auf einer DVD (siehe 5.3.) konnte zu jedem beliebigen Zeitpunkt die Auswertung der Bilder durchgeführt werden. Hierzu wurde das computerassistierte Bildverarbeitungssystem CapImage (Version 6.02; Dr. Zeintl, Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Mit Hilfe des 10x Objektivs wurden am Tag 0, d.h. am Tag der Implantation der Gewebekonstrukte in die Rückenhautkammer, randomisiert zehn bis fünfzehn präformierte Blutgefäße im Zentrum der Implantate ausgewählt und diese an den Tagen 3, 6, 10 und 14 erneut mikroskopiert, um ihre Reperfusion analysieren zu können. Reperfundierte Gefäße wurden in Prozent der Gesamtzahl der analysierten Gefäße angegeben.

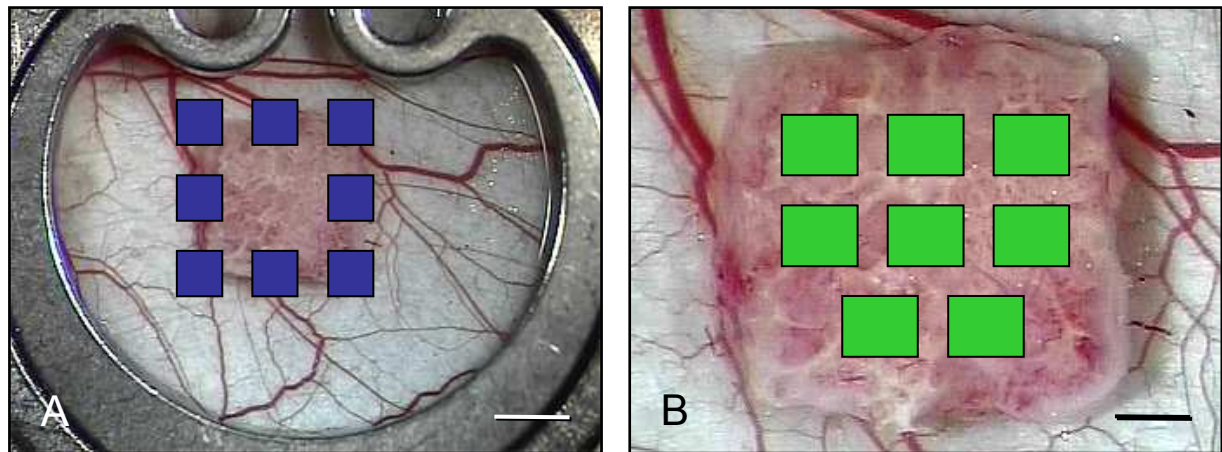
Mit Hilfe des 20x Objektivs wurden sowohl im Randbereich der Gewebekonstrukte als auch im Zentrum die funktionelle Kapillardichte und die perfundierten Regions of Interest (ROIs) bestimmt. Ausschließlich im Zentrum der Konstrukte erfolgte die Messung des Gefäßdurchmessers, der Blutzellgeschwindigkeit, des Blutvolumenflusses und der Scherrate einzelner Gefäße. Zur Messung der mikrozirkulatorischen Parameter wurde das implantierte Gewebekonstrukt in 8 Randbereiche und 8 Bereiche im Zentrum (*Abbildung 8A und B*) eingeteilt. An allen Untersuchungstagen und bei allen Versuchstieren wurde diese Einteilung beibehalten, so dass die Meßergebnisse miteinander vergleichbar waren.

#### **5.3.1.1. Perfundierte ROIs**

Die Vaskularisierung der implantierten Gewebekonstrukte wurde durch die Auszählung perfundierter ROIs analysiert. Mit dem 20x Objektiv wurde an den jeweiligen



Untersuchungstagen ermittelt, ob eine ROI bereits perfundierte Blutgefäße aufwies. Die perfundierten ROIs wurden ausgezählt und in Prozent aller ausgewerteten ROIs angegeben.



**Abbildung 8:** *A, B: Operationsmikroskopische Aufnahmen eines Gewebekonstrukts nach Implantation in die Rückenhautkammer. Einteilung der einzelnen ROIs in 8 Randbereiche (A) und 8 Bereiche im Zentrum (B) des Gewebekonstrukts (Maßstab: A = 1,5mm; B = 580µm).*

#### 5.3.1.2. Funktionelle Kapillardichte

In dem jeweiligen ROI des Gewebekonstrukts wurden die neugebildeten Kapillaren sowie die reperfundierten Blutgefäße auf dem Computermonitor mit der Maus nachgefahren. Dadurch konnte ihre Gesamtlänge ermittelt und ihre Dichte pro Beobachtungsfeld in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  errechnet werden. Hierzu wurden nur Gefäße berücksichtigt, die zum Untersuchungszeitpunkt mit Erythrozyten perfundiert waren.

#### 5.3.1.3. Gefäßdurchmesser

Zur Messung des Durchmessers einzelner Gefäße wurden zwei senkrecht zum Gefäß liegende Randpunkte miteinander verbunden und die Länge der Verbindungsstrecke in  $\mu\text{m}$  bestimmt. Je Untersuchungstag wurde die Messung an mindestens zehn bis fünfzehn Gefäßen im Zentrum der Gewebekonstrukte vorgenommen. Zur Standardisierung wurden nur Gefäße erfasst, die die horizontale Mittelachse eines Beobachtungsfeldes in senkrechtem Verlauf kreuzten.

#### 5.3.1.4. Blutzellgeschwindigkeit

Die Blutzellgeschwindigkeit in einzelnen Gefäßen wurde mittels der computerassisierten Line-Shift-Diagramm-Methode bestimmt [KLYSCZ et al., 1997]. Die Messung wurde an den Blutgefäßen durchgeführt, bei denen zuvor die Bestimmung des Durchmessers erfolgte. Hierfür wurde eine Messlinie in das Zentrum des Gefäßlumens gelegt, die entlang der Blutflussrichtung ausgerichtet war. Dann wurde die DVD für etwa zehn Sekunden abgespielt. Während dieser Zeit wurde für jedes Halbbild entlang der Messlinie ein Grauwertprofil erstellt und in einem separaten Bildspeicher aufgezeichnet. Auf diese Weise ergaben sich aneinandergereihte Grauwertprofile, aus denen der Computer ein Line-Shift-Diagramm erzeugte. In diesem Diagramm waren helle und dunkle Linien zu erkennen, wenn sich während der Messung Blutplasma bzw. Erythrozyten entlang der Messlinie fortbewegten. Aus der Steigung dieser Linien wurde die Blutzellgeschwindigkeit in  $\mu\text{m/s}$  errechnet.

#### 5.3.1.5. Blutvolumenfluss

Der Blutvolumenfluss eines Gefäßes errechnet sich als Produkt der Blutzellgeschwindigkeit und des Gefäßquerschnitts. Bei den untersuchten Gefäßen würde diese Berechnung allerdings zu einer Überschätzung des Blutvolumenflusses führen, da die untersuchten Gefäße im Randbereich eine geringere Fließgeschwindigkeit als im Zentralstrom aufwiesen [BAKER und WAYLAND, 1974]. Daher wurde ein Korrekturfaktor von 1,6 verwendet. Diesen Faktor bezeichnet man nach seinen Erstbeschreibern als Baker-Wayland-Proportionalitätsfaktor [BAKER und WAYLAND, 1974]. Für die Berechnung des Blutvolumenflusses  $Q$  ergab sich damit folgende Formel:

$$Q = \pi * (d/2)^2 * v / 1,6 \text{ [pl/s]}$$

wobei die Variable  $d$  für den Durchmesser des Einzelgefäßes und  $v$  für die gemessene Blutzellgeschwindigkeit steht.

#### 5.3.1.6. Scherrate

Die Scherrate  $\gamma$  basiert auf der Newton'schen Definition:

$$\gamma = 8 * v / d$$

$v$  steht für die Blutzellgeschwindigkeit und  $d$  für den Gefäßdurchmesser. Die Formel diente der Berechnung von Scherkräften, die auf die Zellen im Gefäß einwirken.

## 5.4. Histologie und Immunhistochemie

### 5.4.1. Histologische Präparate

Nach Abschluss der letzten intravitalmikroskopischen Untersuchung am Tag 14 wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Anästhetikum euthanasiert und das Gewebe der Rückenhautkammer vorsichtig exzidiert, um es nachfolgend histologisch sowie immunhistochemisch untersuchen zu können. Hierbei wurde das implantierte Gewebekonstrukt mit seinem umgebenden Empfängergewebe längs halbiert. Die eine Hälfte wurde in 4%-iger Formaldehydlösung bei 20°C für 24 Stunden fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es erfolgte dann die Anfertigung 5µm dicker Serienschnitte, die mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt wurden. Die andere Hälfte des Präparats wurde in Tissue-Tek (O.C.T.™; Kitzingen, Deutschland) eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C bis zur Herstellung von Kryoschnitten gelagert.

Mit Hilfe verschiedener immunhistochemischer Färbungen konnten apoptotische Zellen, GFP-positive Gefäße und glatte Muskelzellen der Gefäße in den Gewebekonstrukten dargestellt werden. Dabei ermöglichte eine Caspase-3-Färbung den immunhistochemischen Nachweis apoptotischer Zellen. Als Marker für glatte Gefäßmuskelzellen sowie Perizyten diente  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) [SCHLINGEMANN et al., 1991]. Zur Unterscheidung neugebildeter GFP-negativer Gefäße von reperfundierten präformierten GFP-positiven Gefäßen wurde eine CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung durchgeführt. CD31 diente hierbei als Endothelzellmarker.

### 5.4.2. Apoptose

Zur Caspase-3-Färbung wurde als Primärantikörper ein polyklonaler Kaninchencleaved Caspase-3-Antikörper (1:100; New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Ein Meerrettichperoxidase-markierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:100; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) diente als Sekundärantikörper. Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion wurde 3,3-Diaminobenzidin verwendet. Nach der Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer konnten die Schnitte lichtmikroskopisch beurteilt werden (BX60; Olympus, Hamburg, Deutschland).

### 5.4.3. CD31- $\alpha$ -SMA-Doppelfluoreszenzfärbung

Zur CD31- $\alpha$ -SMA-Doppelfluoreszenzfärbung wurde als Primärantikörper ein Ratte-Anti-Maus CD31-Antikörper (1:25; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Über Nacht fand bei 4°C die Inkubation der Schnitte mit dem Antikörper statt. Am folgenden Tag diente als zweiter Primärantikörper ein polyklonaler Kaninchen- $\alpha$ -SMA-Antikörper (1:100; Abcam, Cambridge, Großbritannien). Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden zwei Sekundärantikörper hinzugegeben. Ein Ziege-Anti-Ratte Cy3-Antikörper (1:600; dianova GmbH), der an den ersten Primärantikörper band, und ein Ziege-Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488-Antikörper (1:200; Invitrogen, Eugene, OR, USA), der an den zweiten Primärantikörper band. Im Anschluss daran erfolgte die Kernfärbung mit Bisbenzimid (1:500; Sigma).

### 5.4.4. CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung

Zur CD31-GFP-Doppelfluoreszenzfärbung wurde als Primärantikörper zunächst ein Ratte-Anti-Maus CD31-Antikörper (1:25; BD Biosciences) verwendet. Ein Ziege-Anti-Ratte Cy3-Antikörper (1:600; dianova GmbH) diente als Sekundärantikörper. Die Schnitte wurden dann in Plastikkuvetten eine Stunde bei 97°C mit 0,05% Citraconsäureanhydrid Puffer (pH 7.4) gekocht und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Über Nacht fand bei 4°C die Inkubation mit einem Ziege-Anti-GFP-Antikörper (1:200; Biomol, Hamburg, Deutschland) statt. Nachfolgend wurden die Schnitte für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad mit einem Biotin-markierten Affe-Anti-Ziege-Antikörper (1:15; Jackson ImmunoResearch, Baltimore, MD, USA) inkubiert. Dieser diente zur Verstärkung des GFP-Signals. Zum Nachweis des Signals wurde FITC-markiertes Streptavidin (1:50; Vector Labs, Burlingame, LA, USA) hinzugegeben, das grün leuchtete. Die Kernfärbung erfolgte mit Bisbenzimid (1:500; Sigma).

### 5.4.5. Auswertung der Färbungen

Sämtliche Schnitte wurden mit einem BX60 Mikroskop (Olympus) quantitativ analysiert. Hierbei wurde der prozentuale Anteil Caspase-3-positiver apoptotischer Zellen in den Gewebekonstrukten bestimmt. Des Weiteren wurde die Dichte CD31-positiver Gefäße ( $\text{mm}^{-2}$ ) sowie der Anteil GFP-positiver Gefäße in den Konstrukten und im umliegenden Empfängergerewebe gemessen. Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil der Gefäße in den Gewebekonstrukten bestimmt, die eine Schicht  $\alpha$ -SMA-positiver Zellen aufwiesen.

## 5.5. Experimentelles Protokoll

### 5.5.1. Versuchsablauf

Insgesamt wurden für diese Arbeit 71 Scaffolds in die Flanken von 18 FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäusen zur Generierung prävasikularisierter Gewebekonstrukte eingesetzt. Anschließend wurden diese je nach Versuchsgruppe unterschiedlich lange kultiviert bzw. nicht kultiviert und danach in die Rückenhautkammern von Wildtyp FVB/N Mäusen implantiert.

Die Kammerpräparation erfolgte 48 Stunden vor Implantation der prävasikularisierten Gewebekonstrukte, damit die Versuchstiere ausreichend Zeit hatten, sich von Narkose und chirurgischem Trauma zu erholen.

Die Implantate wurden direkt nach Implantation sowie an den Untersuchungstagen 3, 6, 10 und 14 mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Während des gesamten Versuchszeitraums wurde makroskopisch der Zustand der Rückenhautkammern beurteilt, so dass entzündete Kammern rechtzeitig aus der Versuchsreihe ausgeschlossen werden konnten.

Nach Abschluss der letzten mikroskopischen Untersuchung am 14. Tag wurden die Versuchstiere durch eine Überdosis Narkose eingeschláfert und Gewebeproben für histologische und immunhistochemische Analysen exzidiert.

### 5.5.2. Versuchsgruppen

Insgesamt wurden in dieser Arbeit sechs Versuchsgruppen analysiert, die sich auf zwei verschiedene Studienabschnitte verteilten.

**Studienabschnitt 1:** 48 Hydroxylapatit-beschichtete Polyurethan-Scaffolds wurden für 20 Tage in die Flanke von 12 FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäusen implantiert und nach Entnahme auf die folgenden 3 Gruppen verteilt:

- Gruppe 1: 16 prävasikularisierte Gewebekonstrukte wurden für 3 Tage in DMEM kultiviert. Davon wurden 8 Gewebekonstrukte direkt nach Kultivierung histologisch und immunhistochemisch analysiert, während die anderen 8 Konstrukte in Rückenhautkammern implantiert wurden.
- Gruppe 2: 16 prävasikularisierte Gewebekonstrukte wurden für 10 Tage in DMEM kultiviert, wobei jeden zweiten Tag ein Austausch des DMEM stattfand. Davon wurden 8 Gewebekonstrukte direkt nach Kultivierung histologisch und immunhistochemisch analysiert, während die anderen 8 Konstrukte in Rückenhautkammern implantiert wurden.
- Kontrolle: 16 prävasikularisierte Gewebekonstrukte, die nicht kultiviert wurden, dienten als Kontrolle. Davon wurden 8 Gewebekonstrukte direkt nach Explantation histologisch und immunhistochemisch analysiert, während die anderen 8 Konstrukte in Rückenhautkammern implantiert wurden.

**Studienabschnitt 2:** 23 Hydroxylapatit-beschichtete Polyurethan-Scaffolds wurden für 20 Tage in die Flanke von 6 FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäusen implantiert und nach Entnahme auf die folgenden 3 Gruppen verteilt:

- Gruppe 1: 7 prävasikularisierte Gewebekonstrukte wurden für 30min in Matrigel eingebettet und danach in Rückenhautkammern implantiert.
- Gruppe 2: 8 prävasikularisierte Gewebekonstrukte wurden für 3 Tage in Matrigel kultiviert und danach in Rückenhautkammern implantiert.
- Kontrolle: 8 prävasikularisierte Gewebekonstrukte, die nicht in Matrigel eingebettet waren, wurden in Rückenhautkammern implantiert und dienten als Kontrolle.

## 5.6. Statistik

Sämtliche Werte wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes ( $MW \pm SEM$ ) angegeben.

Bei Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen an den einzelnen Untersuchungstagen mittels „one way analysis of variance for multiple comparisons“ (ANOVA) gefolgt vom Student Newman Keuls-Test für den unverbundenen Paarvergleich. Signifikante Unterschiede von Werten innerhalb einer Gruppe wurden mit Hilfe des gepaarten Student's t-Test und der Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen ermittelt.

Die statistischen Tests wurden unter Verwendung des Software Pakets SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) durchgeführt. Bei der Prüfung wurden Unterschiede mit  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

## **6. Ergebnisse**

### **6.1. Mikrozirkulation der Rückenhautkammer**

Während des gesamten Beobachtungszeitraums konnten die Gefäße des als Empfängergerewebe dienenden, quergestreiften Hautmuskels der Rückenhautkammer nach intravenöser Gabe des Plasmamarkers FITC-Dextran (5%) mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie kontrastreich dargestellt werden.

Das physiologische Gefäßsystem des Gewebes in der Rückenhautkammer besteht aus terminalen Arteriolen, die sich in nutritive Kapillaren aufzweigen, sowie aus postkapillaren Venolen und Sammelvenolen. Die terminalen Arteriolen besitzen einen geradlinigen Verlauf sowie eine glatte Wandstruktur und verzweigen sich innerhalb der Rückenhautkammer noch ein- bis zweimal in nachgeschaltete Arteriolen, die ihrerseits das nutritive Kapillarbett mit sauerstoffreichem Blut versorgen. In einem Abstand von ca. 40-60µm sind die Kapillaren parallel zueinander angeordnet und durch strickleiterartige Querverbindungen miteinander verbunden. Nachdem in den Kapillaren der Stoffaustausch stattgefunden hat, wird das sauerstoffarme Blut über postkapillare Venolen und Sammelvenolen drainiert. Diese Venolen können intravital-mikroskopisch aufgrund ihrer Flussrichtung, der unregelmäßigen Wandstruktur und des langsameren Blutflusses von den terminalen Arteriolen unterschieden werden.

### **6.2. Inoskulation von Gewebekonstrukten nach in situ Prä-vaskularisierung und Kultivierung in DMEM**

#### **6.2.1. Gefäßnetzwerke der Gewebekonstrukte**

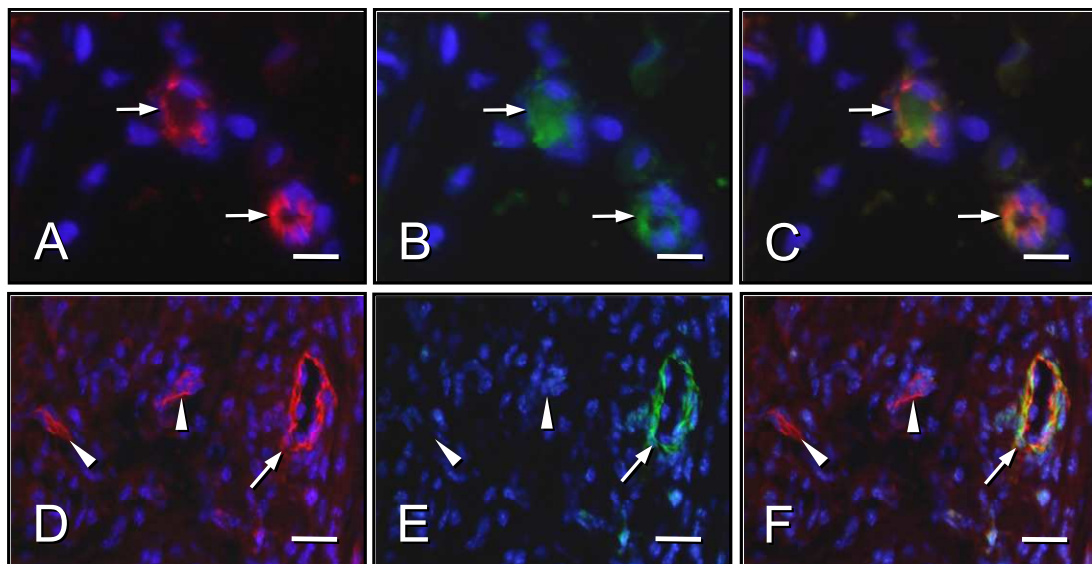
Zur in situ Generierung prävaskularisierter Gewebekonstrukte wurden Hydroxylapatit-beschichtete Polyurethan-Scaffolds für 20 Tage in die Flanke von transgenen FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäusen implantiert. Auf diese Weise wuchsen die das Scaffold umgebenden GFP-positiven Blutgefäße des Empfängergerewebes in die Kon-



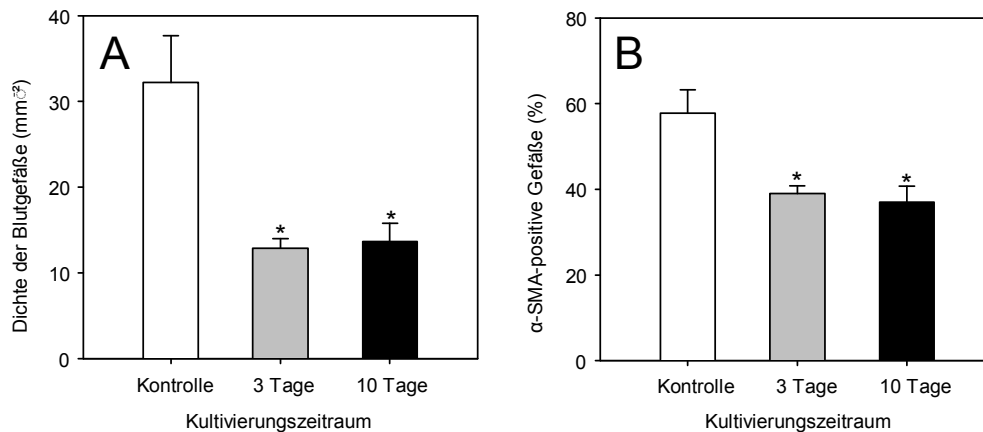
strukture ein (Abbildung 9A-C). Am Tag ihrer Entnahme wiesen die Konstrukte eine Gefäßdichte von  $\sim 32 \text{ mm}^{-2}$  auf (Abbildung 9D-F und 10A).

Anhand der immunhistochemischen Detektion von  $\alpha$ -SMA konnte gezeigt werden, dass  $\sim 58\%$  der neugebildeten Gefäße in den Gewebekonstrukten bereits mit perivaskulären glatten Muskelzellen bedeckt waren (Abbildung 9D-F und 10B).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe führte die Kultivierung der prävascularisierten Gewebekonstrukte für 3 bzw. 10 Tage in DMEM zu einer signifikanten Verringerung der Dichte von Blutgefäßen (Abbildung 10A). Weiterhin verringerte sich während des Kultivierungszeitraums in beiden kultivierten Gruppen der Anteil  $\alpha$ -SMA-positiver Gefäße auf 37-39% (Abbildung 10B).



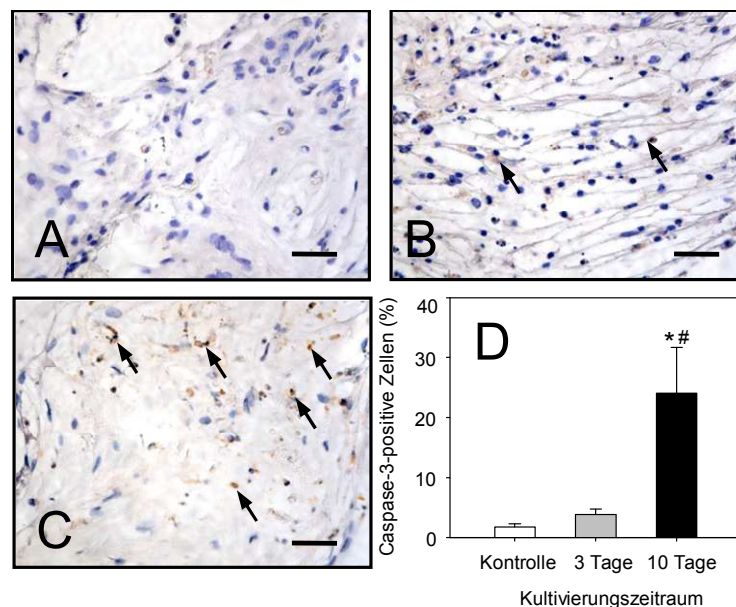
**Abbildung 9: A-F:** Immunhistochemische Färbungen präformierter Blutgefäße in einem Gewebekonstrukt direkt nach Entnahme aus der Flanke einer FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Maus. Die Schnittpräparate wurden zur Darstellung der Zellkerne mit Bisbenzimid (A-F, blau), zum Nachweis mikrovaskulärer Endothelzellen mit einem CD31-Antikörper (A, D, rot), zur Detektion GFP-positiver Endothelzellen mit einem GFP-Antikörper (B, grün) und zur Darstellung perivaskulärer Zellen mit einem  $\alpha$ -SMA-Antikörper (E, grün) gefärbt. Abbildung C setzt sich zusammen aus A und B; F setzt sich zusammen aus D und E. Die präformierten Blutgefäße sind sowohl für CD31 als auch für GFP positiv (A-C, Pfeile). Zusätzlich sind einige Blutgefäße  $\alpha$ -SMA positiv (D-F, Pfeile), während bei anderen die perivaskuläre Zellschicht fehlt (D-F, Pfeilspitzen) (Maßstab: A-C =  $12\mu\text{m}$ ; D-F =  $20\mu\text{m}$ ).



**Abbildung 10: A, B:** Dichte der Blutgefäße (mm<sup>-2</sup>) und Anteil α-SMA-positiver Gefäße (%) in prävascularisierten Gewebekonstrukten direkt nach Entnahme aus der Flanke von Spendertieren (Kontrolle, weißer Balken) sowie nach dreitägiger (grauer Balken) oder zehntägiger Kultivierung (schwarzer Balken) in DMEM. Mittelwerte ± SEM. \*P<0,05 vs. Kontrolle.

### 6.2.2. Apoptotische Zellen in den Gewebekonstrukten

Durch eine Caspase-3-Färbung wurden apoptotische Zellen in den Gewebekonstrukten nachgewiesen. In den Konstrukten der Kontrollgruppe fand sich dabei ein Anteil von ~1,8% apoptotischen Zellen (Abbildung 11A und D).

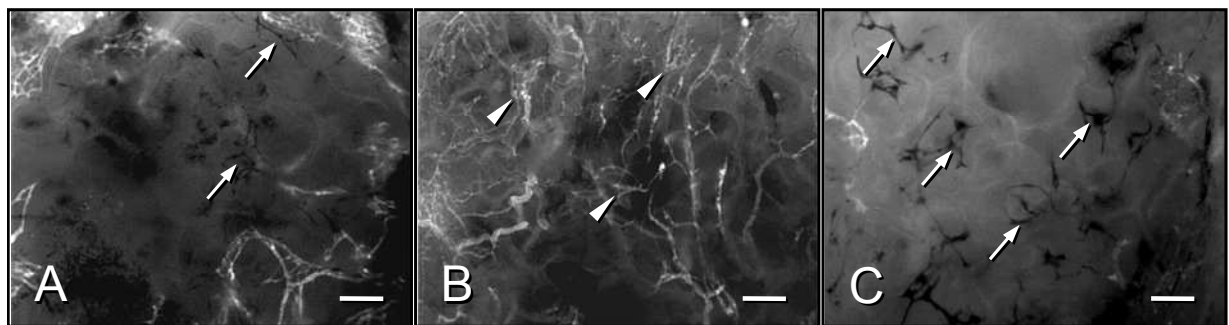


**Abbildung 11: A-C:** Immunhistochemische Caspase-3-Färbung apoptotischer Zellen (Pfeile) in prävascularisierten Gewebekonstrukten direkt nach Entnahme aus Spendermäusen (A) sowie nach dreitägiger (B) oder zehntägiger Kultivierung (C) in DMEM (Maßstab: A-C = 50 μm). **D:** Caspase-3-positive Zellen (%) in Gewebekonstrukten der Kontrollgruppe (weißer Balken) sowie in Konstrukten, die für 3 Tage (grauer Balken) oder 10 Tage (schwarzer Balken) kultiviert wurden. Mittelwerte ± SEM. \*P<0,05 vs. Kontrolle; #P<0,05 vs. 3 Tage.

Die für 3 Tage kultivierten Gewebekonstrukte wiesen einen vergleichbaren Anteil apoptotischer Zellen auf (*Abbildung 11B und D*). Im Gegensatz dazu führte die zehntägige Kultivierung der Gewebekonstrukte zu einem massiven Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen auf ~24% (*Abbildung 11C und D*).

### 6.2.3. Vaskularisierung implantierter Gewebekonstrukte

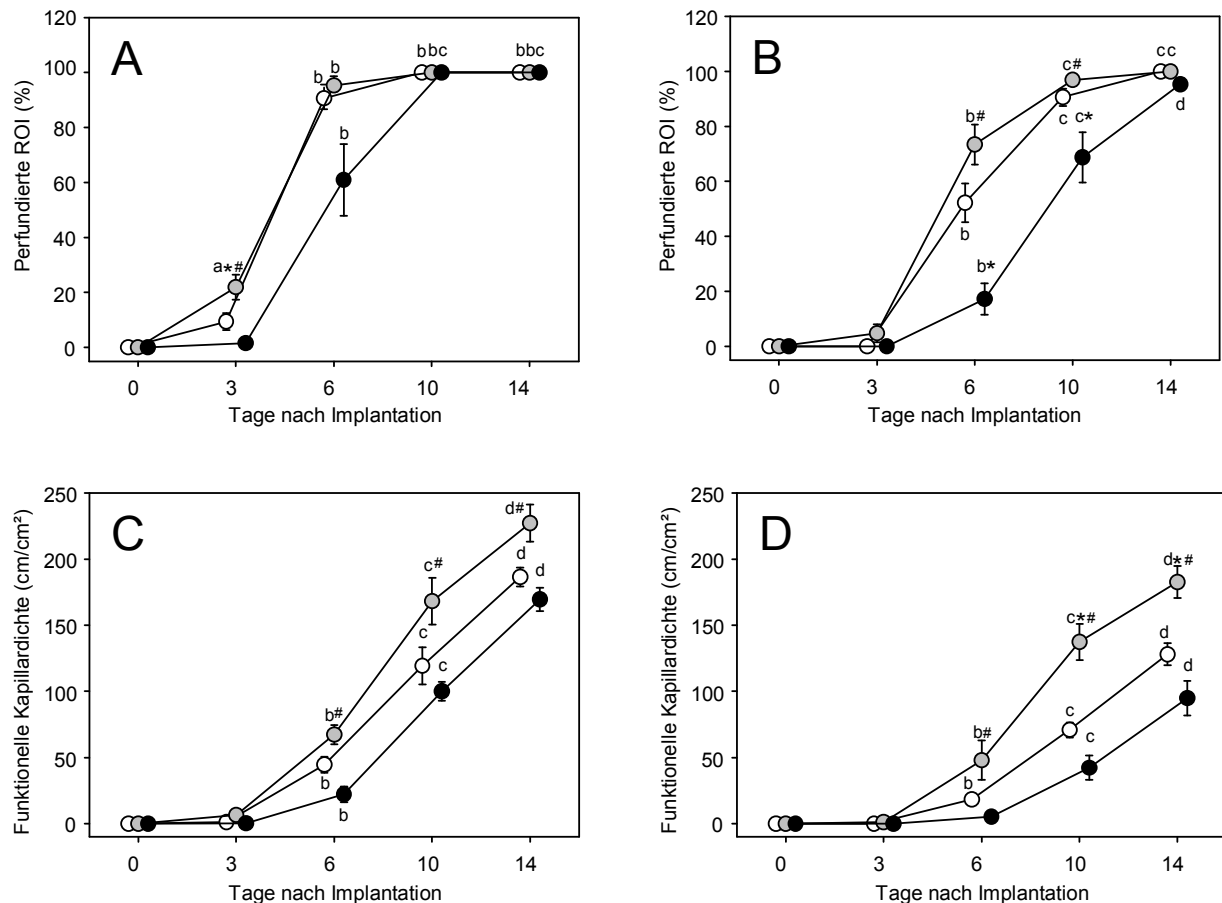
Unter Verwendung der Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie war es möglich, in vivo die Durchblutung der prävascularisierten Gewebekonstrukte nach Implantation in die Rückenhautkammer zu untersuchen (*Abbildung 12 und 13*). Dabei konnten in der Kontrollgruppe frühestens ab Tag 3 perfundierte Areale (= Regions of interest, ROI) im Randbereich und ab Tag 6 im Zentrum der Konstrukte nachgewiesen werden.



**Abbildung 12: A-C:** Intravitalmikroskopische Aufnahmen von Blutgefäßen im Zentrum von Gewebekonstrukten am 10. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von Wildtyp FVB/N Mäusen. Die Konstrukte der Kontrollgruppe (A) und die für 10 Tage in DMEM kultivierten Gewebekonstrukte (C) besitzen viele präformierte, aber noch nicht durchblutete Gefäße (Pfeile). Die für 3 Tage kultivierten Gewebekonstrukte (B) weisen dagegen bereits ein dicht durchblutetes Gefäßnetzwerk auf (B, Pfeilspitzen) (intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran 5% in Blaulicht-Epi-Illumination; Maßstab = 250µm).

In den folgenden Tagen stieg die Anzahl perfundierter Blutgefäße schnell an, so dass 80-100% der untersuchten Areale an den Tagen 10 bis 14 durchblutet waren. Die für 3 Tage kultivierten Gewebekonstrukte wiesen eine verbesserte Vaskularisierung auf. Diese war im Vergleich zur Kontrollgruppe durch eine signifikante Erhöhung perfundierter Areale am 3. Untersuchungstag im Randbereich (*Abbildung 13A*) gekennzeichnet. Zusätzlich konnten in der für 3 Tage kultivierten Gruppe bereits am 3. Tag

nach Implantation durchblutete Areale im Zentrum der Gewebekonstrukte nachgewiesen werden (Abbildung 13B).



**Abbildung 13: A-D: Perfundierte ROI (%) (A, B) und funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) (C, D) im Randbereich (A, C) und im Zentrum (B, D) von in situ prävasikularisierten Gewebekonstrukten, die direkt aus der Flanke von Spendermäusen in die Rückenhautkammer implantiert wurden (Kontrollgruppe, weiße Kreise) bzw. zuvor für 3 Tage (graue Kreise) oder 10 Tage (schwarze Kreise) kultiviert wurden. Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 0 innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 0 und 3 innerhalb einer Gruppe; <sup>c</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb einer Gruppe; <sup>d</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 0, 3, 6 und 10 innerhalb einer Gruppe; \* $P < 0,05$  vs. Kontrolle; # $P < 0,05$  vs. 10 Tage Kultivierung.**

Bei den für 10 Tage kultivierten Gewebekonstrukten war die Vaskularisierung verzögert. Dies machte sich im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen besonders im Zentrum der Konstrukte bemerkbar. Dort lag der Anteil perfundierter Areale bei nur 17% am 6. Tag und 69% am 10. Tag (Abbildung 13B). Weiterhin konnten deutliche Unterschiede der funktionellen Kapillardichte zwischen den drei Gruppen gefunden werden. Die für 3 Tage kultivierten Gewebekonstrukte wiesen sowohl im Randbereich als auch im Zentrum im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte funktionelle

Kapillardichte zwischen den Tagen 6 bis 14 auf (*Abbildung 13C und D*). Dagegen war die funktionelle Kapillardichte in den für 10 Tage kultivierten Gewebekonstrukten im Randbereich und im Zentrum deutlich verringert (*Abbildung 13C und D*).

#### **6.2.4. Mikrohämodynamische Parameter implantierter Gewebekonstrukte**

Die Gefäße der Gewebekonstrukte in der Kontrollgruppe wiesen zwischen den Tagen 6 bis 14 vergleichbare Gefäßdurchmesser von 20-22µm auf (*Tabelle 1*). Die Blutgefäße in den für 3 Tage kultivierten Gewebekonstrukten hatten einen Durchmesser von 16-20µm. Diese Gefäßdurchmesser blieben während des Beobachtungszeitraums nahezu unverändert (*Tabelle 1*). Vergleichbare Gefäßdurchmesser wiesen auch die für 10 Tage kultivierten Gewebekonstrukte auf. Hier lagen die Durchmesser zwischen 17 und 21µm an den Tagen 6 bis 14 (*Tabelle 1*).

In der für 3 Tage kultivierten Gruppe konnten bereits am 3. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer perfundierte Gefäße nachgewiesen werden. Mit Zunahme perfundierter Gefäße im Zentrum der Gewebekonstrukte stiegen in allen 3 Versuchsgruppen die Blutzellgeschwindigkeiten an (*Tabelle 1*). Am 6. Untersuchungstag zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, denn die für 3 Tage kultivierten Gewebekonstrukte wiesen bereits eine Blutzellgeschwindigkeit von ~100 µm/s auf. Der Grund hierfür war die im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen frühere Durchblutung der für 3 Tage kultivierten Konstrukte. Die Berechnungen der Blutvolumenflüsse und der Scherraten ergaben zwischen den Tagen 3 bis 10 die höchsten Werte in den für 3 Tage kultivierten Gewebekonstrukten (*Tabelle 1*).

#### **6.2.5. Inoskulation und Inkorporation implantierter Gewebekonstrukte**

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die Reperfusion präformierter Gefäßnetzwerke untersucht (*Abbildung 14 und 15*).

**Gefäßdurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]**

Tag	3	6	10	14
Kontrolle	--	$21.9 \pm 0.6$	$20.8 \pm 1.1$	$20.4 \pm 1.3$
3 Tage Kultivierung	$16.4 \pm 2.4$	$19.8 \pm 1.1$	$20.2 \pm 1.0$	$16.6 \pm 0.6^*$
10 Tage Kultivierung	--	$17.0 \pm 1.4^*$	$21.3 \pm 1.4$	$17.9 \pm 0.6$

**Blutzellgeschwindigkeit [ $\mu\text{m/s}$ ]**

Tag	3	6	10	14
Kontrolle	--	$40.5 \pm 4.4$	$105.6 \pm 8.9^a$	$147.9 \pm 8.6^b$
3 Tage Kultivierung	$57.7 \pm 18.3$	$100.1 \pm 10.5^{* \#}$	$137.8 \pm 11.3$	$148.0 \pm 4.9^c$
10 Tage Kultivierung	--	$64.5 \pm 9.3$	$99.0 \pm 12.7^a$	$133.2 \pm 10.5^b$

**Blutvolumenfluss [ $\text{pl/s}$ ]**

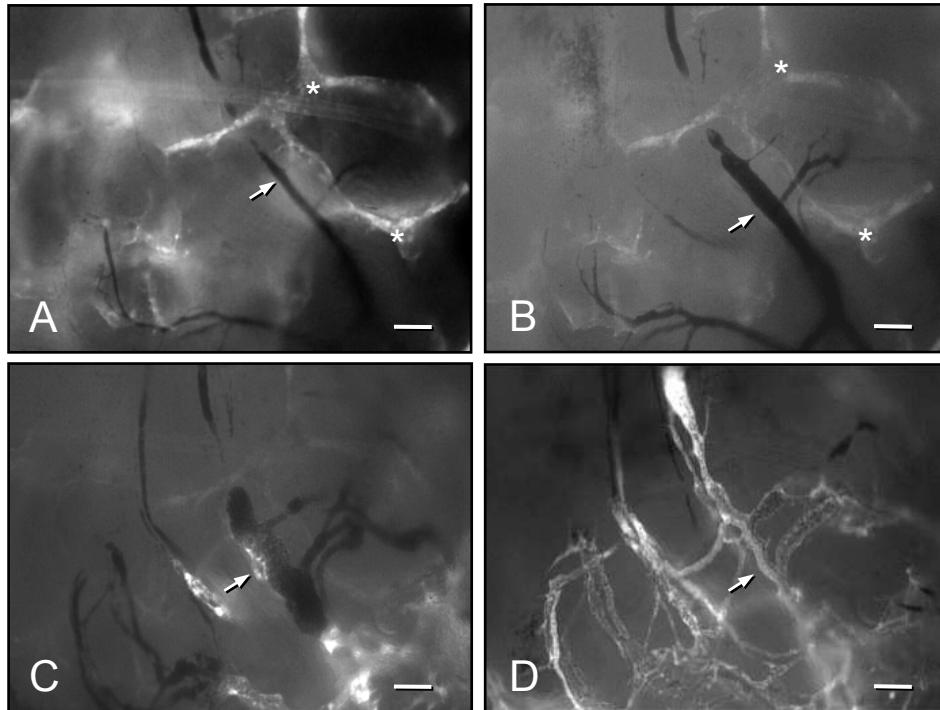
Tag	3	6	10	14
Kontrolle	--	$28.1 \pm 3.5$	$65.4 \pm 10.3^a$	$92.6 \pm 15.5^a$
3 Tage Kultivierung	$22.2 \pm 3.5$	$40.5 \pm 3.0$	$92.6 \pm 14.4^c$	$57.2 \pm 4.5$
10 Tage Kultivierung	--	$26.4 \pm 6.8$	$66.4 \pm 13.8^a$	$67.6 \pm 11.3^a$

**Scherrate [ $\text{s}^{-1}$ ]**

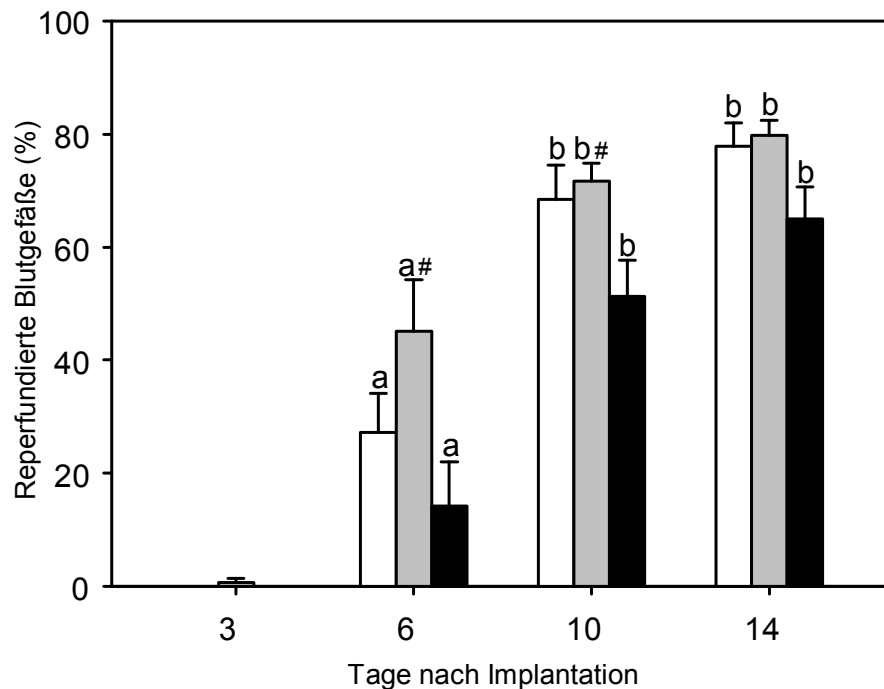
Tag	3	6	10	14
Kontrolle	--	$16.4 \pm 2.1$	$46.8 \pm 6.3^a$	$66.8 \pm 5.4^b$
3 Tage Kultivierung	$30.0 \pm 13.4$	$44.9 \pm 5.6^*$	$57.1 \pm 6.1$	$76.7 \pm 3.7^c$
10 Tage Kultivierung	--	$30.3 \pm 3.4$	$39.1 \pm 5.2$	$61.3 \pm 4.4^b$

**Tabelle 1:** Gefäßdurchmesser ( $\mu\text{m}$ ), Blutzellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ ), Blutvolumenfluss ( $\text{pl/s}$ ) und Scherrate ( $\text{s}^{-1}$ ) in perfundierten Blutgefäßen im Zentrum implantierter Gewebekonstrukte über den Untersuchungszeitraum von 14 Tagen. Die in situ prävascularisierten Konstrukte wurden entweder direkt aus der Flanke von Spendermäusen in die Rückenhautkammer implantiert (Kontrolle) bzw. zuvor für 3 Tage oder 10 Tage kultiviert. Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 6 innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 6 und 10 innerhalb einer Gruppe; <sup>c</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 3 und 6 innerhalb einer Gruppe. \* $P < 0,05$  vs. Kontrolle; # $P < 0,05$  vs. 10 Tage Kultivierung.

Quantitative Analysen reperfundierter Blutgefäße in den Gewebekonstrukten zeigten, dass in der für 3 Tage kultivierten Gruppe eine schnellere Reperfusion der präformierten Blutgefäße erfolgte. Diese wiesen im Vergleich zu den für 10 Tage kultivierten Gewebekonstrukten zwischen dem 6. und 10. Untersuchungstag eine signifikant erhöhte Anzahl reperfundierter Gefäße nach Implantation in die Rückenhautkammer auf (Abbildung 15).



**Abbildung 14: A-D:** Intravitalmikroskopische Aufnahmen eines präformierten Blutgefäßes (Pfeil) im Zentrum eines in situ prävaskularisierten Gewebekonstrukts, das direkt aus der Flanke einer Spendermaus in die Rückenhautkammer eines Empfängertieres implantiert wurde. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden am Tag der Implantation in die Rückenhautkammer (A) sowie am 3. (B), 6. (C) und 10. (D) Untersuchungstag gemacht. An den Tagen 0 und 3 stellt sich das Gefäß aufgrund einer fehlenden Durchblutung schwarz dar (A, B). Die mangelnde Perfusion führt zu einer Hypoxie-bedingten Dilatation des Gefäßes (Vergleich zwischen A und B). Am 6. Tag ist eine beginnende Durchblutung des Gefäßes erkennbar (C). Eine vollständige Reperfusion des Gefäßes erfolgt am Tag 10 (D). Diese Beobachtung beweist, dass das präformierte Gefäß im Gewebekonstrukt nach Implantation in die Rückenhautkammer dazu in der Lage ist, einen Anschluss an die Blutgefäße des Empfängers herzustellen (intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran 5% in Blaulicht-Epi-Illumination; Maßstab = 140µm; Sternchen = Scaffold).

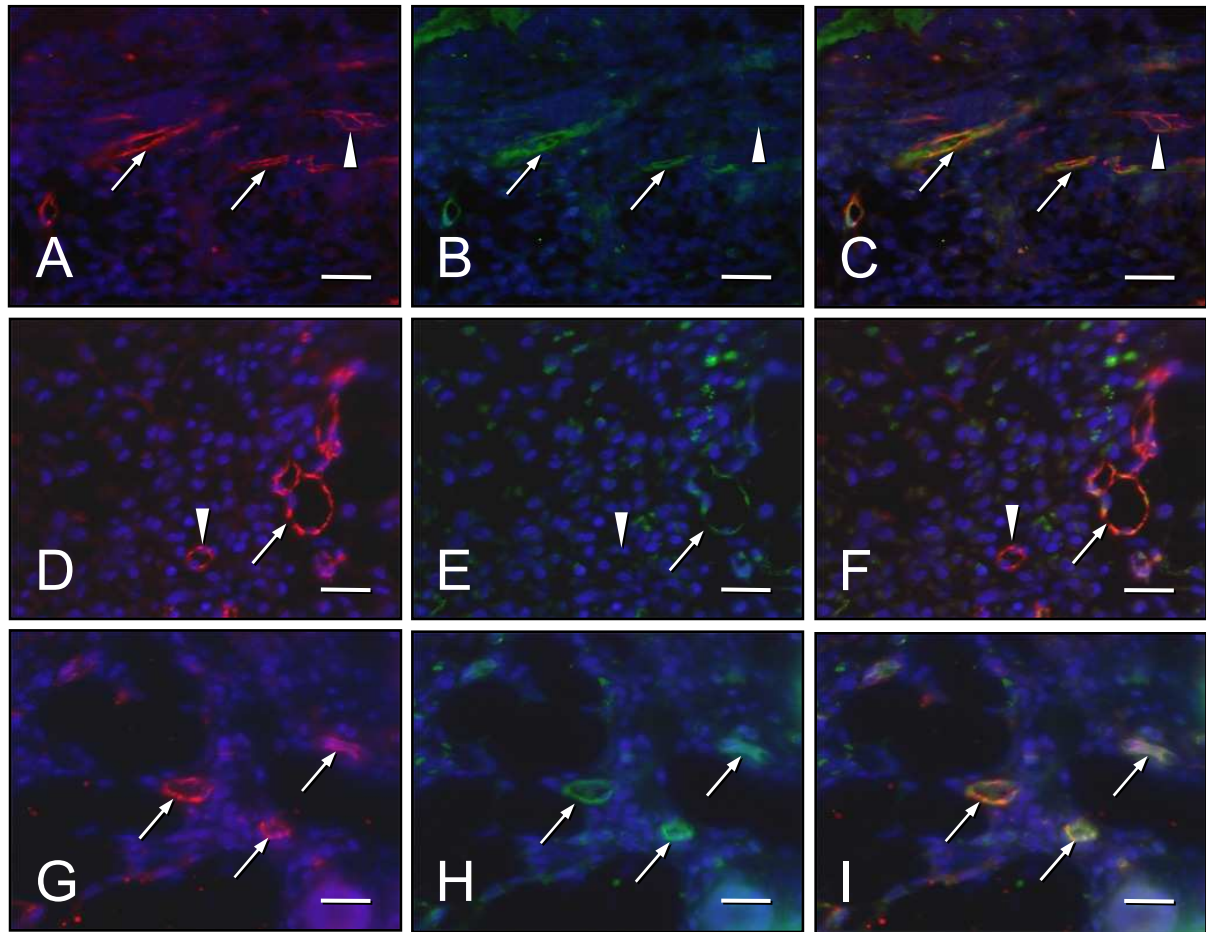


**Abbildung 15:** Reperfundierte Blutgefäße (%) von *in situ* prävascularisierten Gewebekonstrukten, die direkt aus der Flanke von Spendermäusen in die Rückenhautkammer implantiert wurden (Kontrollgruppe, weißer Balken) bzw. zuvor für 3 Tage (grauer Balken) oder 10 Tage (schwarzer Balken) kultiviert wurden. Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 3 innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 3 und 6 innerhalb einer Gruppe; <sup>#</sup> $P < 0,05$  vs. 10 Tage Kultivierung.

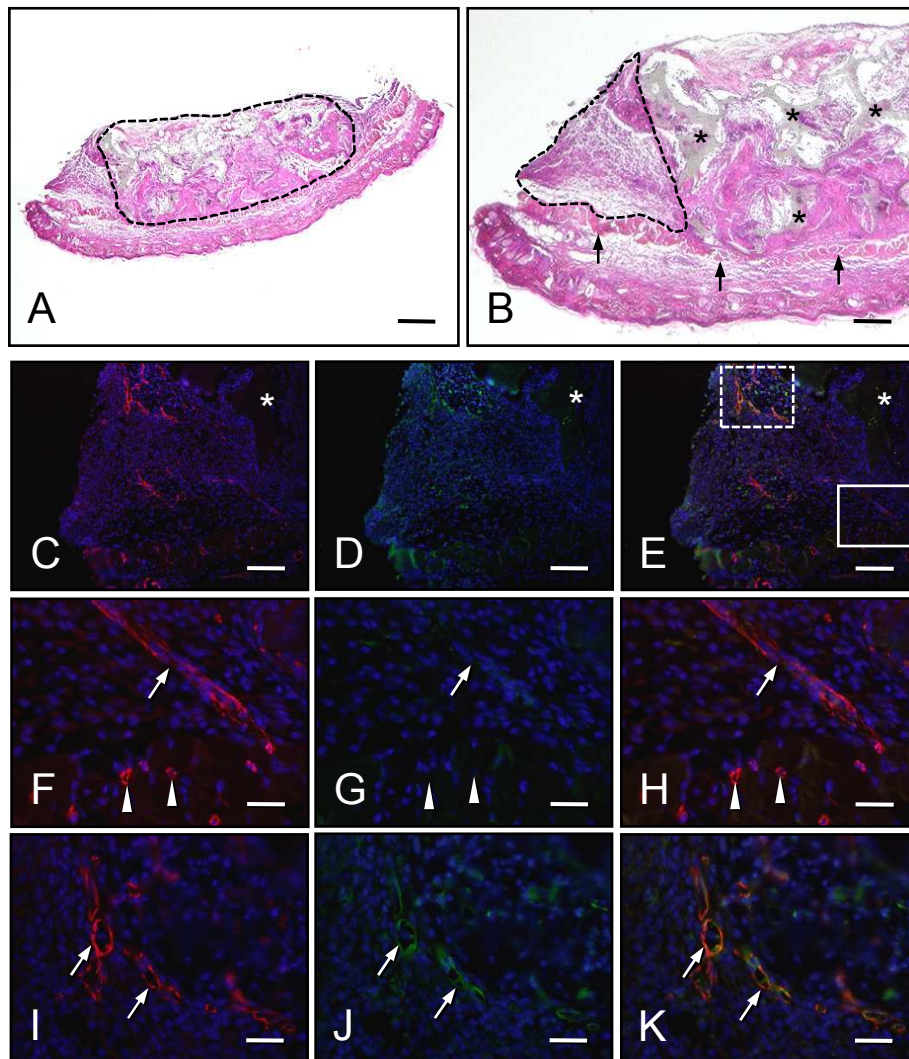
Bei den immunhistochemischen Untersuchungen im Anschluss an den vierzehntägigen Versuchszeitraum wurden in allen 3 Gruppen GFP-positive Blutgefäße im Zentrum der Gewebekonstrukte nachgewiesen (*Abbildung 16*). Dies lässt darauf schließen, dass die präformierten Gefäße in den Gewebekonstrukten überlebten und während des Versuchszeitraums einen Anschluss an die Blutgefäße des Empfängers herstellen konnten. Andererseits wurden im Zentrum der Konstrukte auch GFP-negative Blutgefäße detektiert, die auf ein Einwachsen der umliegenden Gefäße des Empfängergewebes in das Gewebekonstrukt schließen lassen (*Abbildung 16A-F*).

Zusätzliche histologische Untersuchungen der Rückenhautkammerpräparationen am Tag 14 zeigten, dass die Konstrukte aller 3 Versuchsgruppen von einem durchbluteten Granulationsgewebe umgeben waren (*Abbildung 17A und B*). Einige Blutgefäße dieses Granulationsgewebes waren GFP-positiv. Dies zeigt, dass es auch zu einem Auswachsen präformierter GFP-positiver Blutgefäße aus den Konstrukten in das umliegende Gewebe kam (*Abbildung 17C-K*).





**Abbildung 16: A-I:** Immunhistochemische Färbungen präformierter Blutgefäße im Zentrum von Gewebekonstrukten am 14. Tag nach Implantation. Die in situ prävascularisierten Gewebekonstrukte wurden direkt aus der Flanke von Spendermäusen in die Rückenhautkammer implantiert (A-C) bzw. zuvor für 3 Tage (D-F) oder 10 Tage (G-I) kultiviert. Die Schnittpräparate wurden zur Darstellung der Zellkerne mit Bisbenzimid (A-I, blau), zum Nachweis mikrovaskulärer Endothelzellen mit einem CD31-Antikörper (A, D, G, rot) und zur Detektion GFP-positiver Endothelzellen mit einem GFP-Antikörper (B, E, H, grün) gefärbt. Abbildung C setzt sich zusammen aus A und B; F setzt sich zusammen aus D und E; I setzt sich zusammen aus G und H. Die Gewebekonstrukte enthalten sowohl CD31- als auch GFP-positive Gefäße (A-I, Pfeile). Diese Beobachtung beweist, dass präformierte Blutgefäße während des 14-tägigen Untersuchungszeitraums überleben konnten. Zusätzlich existieren GFP-negative Gefäße (A-F, Pfeilspitzen) in den Gewebekonstrukten. Dies beweist das Einwachsen von Blutgefäßen aus dem Empfängergerewebe in die Konstrukte (Maßstab = 24µm).

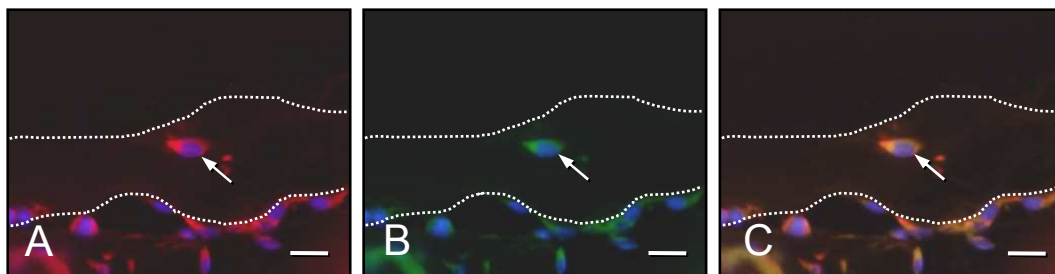


**Abbildung 17:** **A, B:** Histologisches Schnittpräparat einer Rückenhautkammer am 14. Tag nach Implantation eines Gewebekonstrukts (A, gestrichelte Linie) aus der Kontrollgruppe. Die quergestreifte Muskulatur des Empfängergewebes ist in höherer Vergrößerung gut sichtbar (B, Pfeile), ebenso die Polyurethan-Stränge des Scaffolds (B, Sternchen) sowie neu entstandenes Granulationsgewebe im Randbereich des Gewebekonstrukts (B, gestrichelte Linie). Dieses Granulationsgewebe trägt zur guten Inkorporation des Implantats in das Empfängergewebe bei. **C-K:** Immunhistochemische Färbungen der Blutgefäße im Randbereich des Gewebekonstrukts. C-E stellen eine Übersicht des Randbereichs dar, der als gestrichelte Linie in B markiert ist. F-K sind höher vergrößerte Gewebeausschnitte, die zum einen entfernt (E, gestrichelte Linie; I-K), zum anderen in unmittelbarer Nähe des quergestreiften Muskels der Kammerpräparation (E, durchgezogene Linie; F-H) liegen. Die Schnittpräparate wurden zur Darstellung der Zellkerne mit Bisbenzimid (C-K, blau), zum Nachweis mikrovaskulärer Endothelzellen mit einem CD31-Antikörper (C, F, I, rot) und zur Detektion GFP-positiver Endothelzellen mit einem GFP-Antikörper (D, G, J, grün) gefärbt. Abbildung E setzt sich zusammen aus C und D; H setzt sich zusammen aus F und G; K setzt sich zusammen aus I und J. Sowohl Blutgefäße in dem quergestreiften Muskel des Empfängers (F-H, Pfeilspitzen) als auch neugebildete Blutgefäße in dem Granulationsgewebe nahe des Empfängergewebes (F-H, Pfeile) sind GFP-negativ. Einige neuformierte Blutgefäße außerhalb des Konstrukts (I-K, Pfeile) sind jedoch CD31- und GFP-positiv. Dies beweist das Auswachsen GFP-positiver Blutgefäße aus dem Konstrukt in das umliegende Empfängergewebe (Maßstab: A = 350µm; B = 150µm; C-E = 90µm; F-K = 32µm).

### 6.3. Inoskulation von Gewebekonstrukten nach in situ Prä-vaskularisierung und Einbettung in Matrigel

#### 6.3.1. Angiogene Stimulation prävaskularisierter Gewebekonstrukte

Die Präkultivierung der in situ generierten prävaskularisierten Gewebekonstrukte für 3 Tage in Matrigel führte zu einem Aussprossen der präformierten Blutgefäße in die extrazelluläre Matrix. Infolgedessen konnten immunhistochemisch in dem das Gewebekonstrukt umgebenden Matrigel CD31/GFP-positive Endothelzellen nachgewiesen werden (*Abbildung 18*).



**Abbildung 18: A-C:** Immunhistochemische Färbungen einer CD31/GFP-positiven Endothelzelle (Pfeil), die in das Gewebekonstrukt umgebende Matrigel migriert ist (gestrichelte Linien stellen die Grenzen des Matrigels dar). Die Schnittpräparate wurden zur Darstellung der Zellkerne mit Bisbenzimid (A-C, blau), zum Nachweis mikrovaskulärer Endothelzellen mit einem CD31-Antikörper (A, rot) und zur Detektion GFP-positiver Zellen mit einem GFP-Antikörper (B, grün) gefärbt. Abbildung C setzt sich zusammen aus A und B (Maßstab: A-C = 14µm).

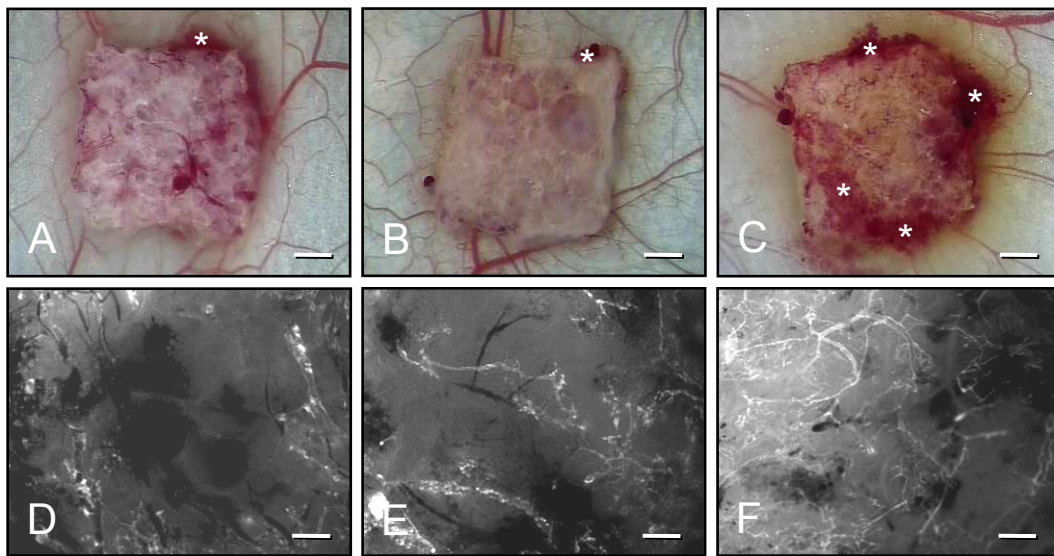
#### 6.3.2. Vaskularisierung implantierter Gewebekonstrukte

In allen 3 Versuchsgruppen konnten nach Implantation der prävaskularisierten Gewebekonstrukte in die Rückenhautkammern von Wildtyp FVB/N Mäusen perfundierte Areale in den Randbereichen der Konstrukte am 3. Untersuchungstag beobachtet werden (*Abbildung 20A*). Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Gewebekonstrukte in den Randbereichen unterschiedlich stark ausgeprägte Einblutungen auf (*Abbildung 19A-C*). Am deutlichsten waren diese Einblutungen bei den für 3 Tage präkultivierten Gewebekonstrukten erkennbar (*Abbildung 19C*).

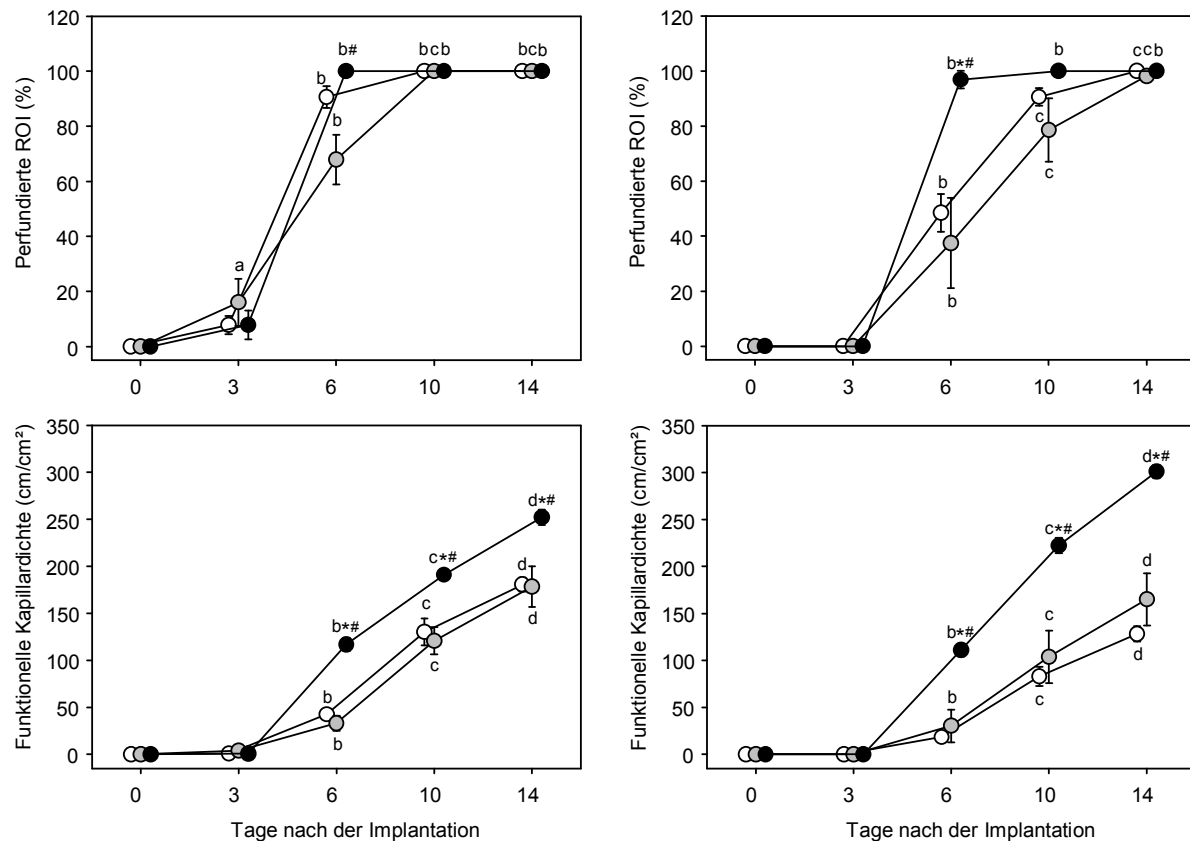
Während des Versuchszeitraums nahm in allen Gruppen die Anzahl durchbluteter Areale im Gewebekonstrukt sowohl im Randbereich als auch im Zentrum schnell zu.



Spätestens am 14. Untersuchungstag waren sämtliche Areale der Gewebekonstrukte durchblutet (*Abbildung 19D-F und 20A-B*). Die für 3 Tage präkultivierten Gewebekonstrukte wiesen im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen bereits am 6. Untersuchungstag eine signifikant höhere Anzahl perfundierter Felder im Zentrum auf (*Abbildung 20B*). Zusätzlich waren die für 3 Tage präkultivierten Gewebekonstrukte im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen durch eine höhere funktionelle Kapillardichte im Randbereich und im Zentrum zwischen den Tagen 6 bis 14 gekennzeichnet (*Abbildung 19D-F und 20C-D*).



**Abbildung 19:** **A-C:** Operationsmikroskopische Aufnahmen von in situ prävaskularisierten Gewebekonstrukten am 3. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer. **D-F:** Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Gewebekonstrukte am 10. Tag nach Implantation. Die in situ prävaskularisierten Gewebekonstrukte wurden direkt aus der Flanke von Spendermäusen in die Rückenhautkammer implantiert (A und D) bzw. zuvor für 30min (B und E) oder 3 Tage (C und F) in Matrigel eingebettet. In den Abbildungen A-C sind unterschiedlich starke Einblutungen in den Konstrukten zu erkennen (A-C, Sternchen). Besonders ausgeprägt sind diese Einblutungen bei den für 3 Tage eingebetteten Konstrukten (C, Sternchen). Zusätzlich sind die für 3 Tage in Matrigel eingebetteten Gewebekonstrukte im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen am 10. Untersuchungstag deutlich besser vaskularisiert (F vs. D und E) (intravital Fluoreszenzmikroskopie, Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran 5% in Blaulicht-Epi-Illumination; Maßstab: A-C = 680µm; D-F = 250µm).



**Abbildung 20: A-D:** Perfundierte ROI (%) (A, B) und funktionelle Kapillardichte (cm/cm<sup>2</sup>) (C, D) im Randbereich (A, C) und im Zentrum (B, D) von *in situ* prävascularisierten Gewebekonstrukten, die direkt aus der Flanke von Spendermäusen in die Rückenhautkammer implantiert wurden (Kontrollgruppe, weiße Kreise) bzw. zuvor für 30min (graue Kreise) oder 3 Tage (schwarze Kreise) in Matrigel eingebettet wurden. Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 0 innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 0 und 3 innerhalb einer Gruppe; <sup>c</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb einer Gruppe; <sup>d</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 0, 3, 6 und 10 innerhalb einer Gruppe; \* $P < 0,05$  vs. Kontrolle; # $P < 0,05$  vs. 30min in Matrigel.

### 6.3.3. Mikrohämodynamische Parameter implantierter Gewebekonstrukte

Die Gefäße der Matrigel-freien Gewebekonstrukte der Kontrollgruppe zeichneten sich durch konstante Gefäßdurchmesser von 19-21 $\mu$ m zwischen den Tagen 6 bis 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer aus (Tabelle 2). Im Gegensatz dazu wiesen die in Matrigel eingebetteten Gewebekonstrukte, unabhängig davon ob sie für 30min oder 3 Tage eingebettet waren, Gefäßdurchmesser von  $\sim$ 18 $\mu$ m am Tag 6 auf, die sich bis Tag 14 auf  $\sim$ 12 $\mu$ m reduzierten (Tabelle 2).

**Gefäßdurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]**

Tag	3	6	10	14
Kontrolle	--	$20.7 \pm 1.5$	$19.8 \pm 1.2$	$19.2 \pm 1.1$
Matrigel	--	$17.5 \pm 2.2$	$14.9 \pm 1.7^*$	$12.0 \pm 0.8^{a*}$
3 Tage Matrigel	--	$17.5 \pm 0.6$	$13.2 \pm 1.0^{a*}$	$11.7 \pm 0.8^{a*}$

**Blutzellgeschwindigkeit [ $\mu\text{m/s}$ ]**

Tag	3	6	10	14
Kontrolle	--	$60.5 \pm 8.1$	$107.7 \pm 9.1^a$	$145.2 \pm 4.9^b$
Matrigel	--	$62.8 \pm 25.0$	$135.3 \pm 17.1^a$	$157.4 \pm 16.7^a$
3 Tage Matrigel	--	$83.1 \pm 8.8$	$157.4 \pm 12.1^{a*}$	$166.0 \pm 9.6^a$

**Blutvolumenfluss [ $\text{pl/s}$ ]**

Tag	3	6	10	14
Kontrolle	--	$46.9 \pm 11.9$	$59.2 \pm 7.1$	$75.5 \pm 8.4^a$
Matrigel	--	$16.1 \pm 5.5$	$46.8 \pm 10.0$	$31.4 \pm 3.6^*$
3 Tage Matrigel	--	$36.2 \pm 5.8$	$43.4 \pm 7.2$	$33.5 \pm 3.7^*$

**Scherrate [ $\text{s}^{-1}$ ]**

Tag	3	6	10	14
Kontrolle	--	$25.3 \pm 3.1$	$52.9 \pm 5.9^a$	$70.7 \pm 3.8^b$
Matrigel	--	$40.3 \pm 17.3$	$87.2 \pm 18.6^a$	$114.2 \pm 16.2^{b*}$
3 Tage Matrigel	--	$42.0 \pm 4.4$	$106.5 \pm 13.1^{a*}$	$127.8 \pm 11.4^{a*}$

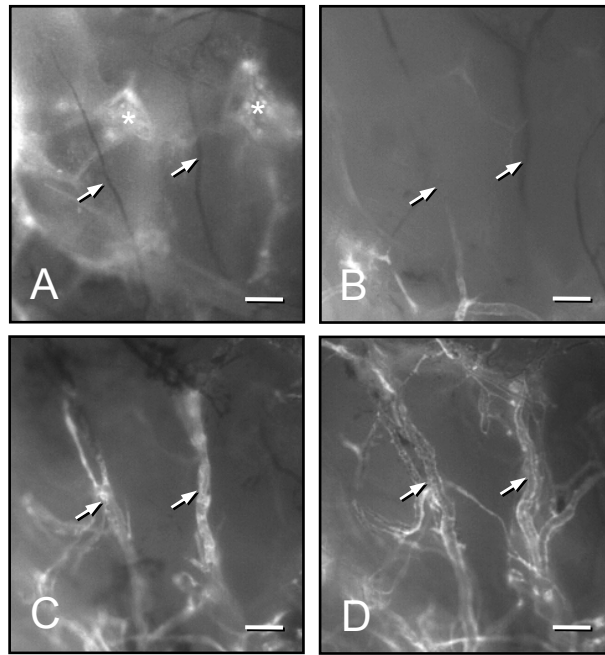
**Tabelle 2:** Gefäßdurchmesser ( $\mu\text{m}$ ), Blutzellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ ), Blutvolumenfluss ( $\text{pl/s}$ ) und Scherrate ( $\text{s}^{-1}$ ) perfundierter Blutgefäße im Zentrum implantierter Gewebekonstrukte über den Untersuchungszeitraum von 14 Tagen. Die in situ prävascularisierten Konstrukte wurden entweder direkt aus der Flanke von Spendermäusen in die Rückenhautkammer implantiert (Kontrolle) bzw. zuvor für 30min (Matrigel) oder 3 Tage in Matrigel eingebettet (3 Tage Matrigel). Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 6 innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 6 und 10 innerhalb einer Gruppe; \* $P < 0,05$  vs. Kontrolle.

In allen 3 Versuchsgruppen stiegen die Blutzellgeschwindigkeiten von 61-83µm/s am 6. Untersuchungstag auf 145-166µm/s am 14. Tag kontinuierlich an (*Tabelle 2*). Dabei fiel auf, dass die für 3 Tage präkultivierten Gewebekonstrukte im Vergleich zur Kontrollgruppe am 10. Untersuchungstag eine signifikant höhere Blutzellgeschwindigkeit aufwiesen. Dies kann durch eine schnellere Vaskularisierung der implantierten Gewebekonstrukte in dieser Gruppe erklärt werden. Der Blutvolumenfluss der in Matrigel eingebetteten Konstrukte war am Tag 14 signifikant reduziert (*Tabelle 2*). Da sich der Blutvolumenfluss aus Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit errechnet, können diese Ergebnisse durch die stärkere Abnahme der Gefäßdurchmesser in den beiden Matrigel-Gruppen erklärt werden. Entsprechend stiegen die Scherraten in den Gefäßen dieser beiden Gruppen im Verlauf des Versuchszeitraums kontinuierlich an und waren am Tag 14 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (*Tabelle 2*).

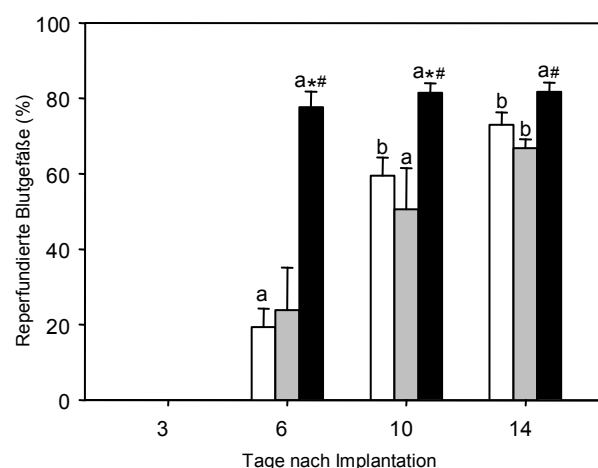
#### **6.3.4. Inoskulation implantierter Gewebekonstrukte**

Wie bereits im ersten Studienabschnitt wurde auch in diesem Studienabschnitt mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die Inoskulation präformierter Gefäßnetzwerke mit den Gefäßen des Empfängers untersucht (*Abbildung 21*). Quantitative Analysen der reperfundierten Blutgefäße im Zentrum der Gewebekonstrukte zeigten, dass die Präkultivierung der Konstrukte für 3 Tage in Matrigel zu einer deutlich beschleunigten Inoskulation führte. Diese Konstrukte wiesen im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen in ihrem Zentrum eine signifikant höhere Anzahl reperfundierter Blutgefäße an den Tagen 6 und 10 auf (*Abbildung 22*). Die Präkultivierung der Gewebekonstrukte in Matrigel führte dabei zu einer vierfach höheren Anzahl reperfundierter Gefäße am 6. Untersuchungstag.

Im Anschluss an den 14. Untersuchungstag wurden Gewebeproben entnommen und immunhistochemisch untersucht (*Abbildung 23*). Es konnte auf diese Weise nachgewiesen werden, dass im Randbereich der für 3 Tage in Matrigel präkultivierten Gewebekonstrukte ein Anteil von  $33\pm 6\%$  der Blutgefäße GFP-positiv waren. Die Konstrukte der Kontrollgruppe hingegen wiesen einen Anteil von  $11\pm 4\%$  und die für 30min in Matrigel eingebetteten Gewebekonstrukte einen Anteil von  $9\pm 5\%$  GFP-positiven Blutgefäßen im Randbereich auf.

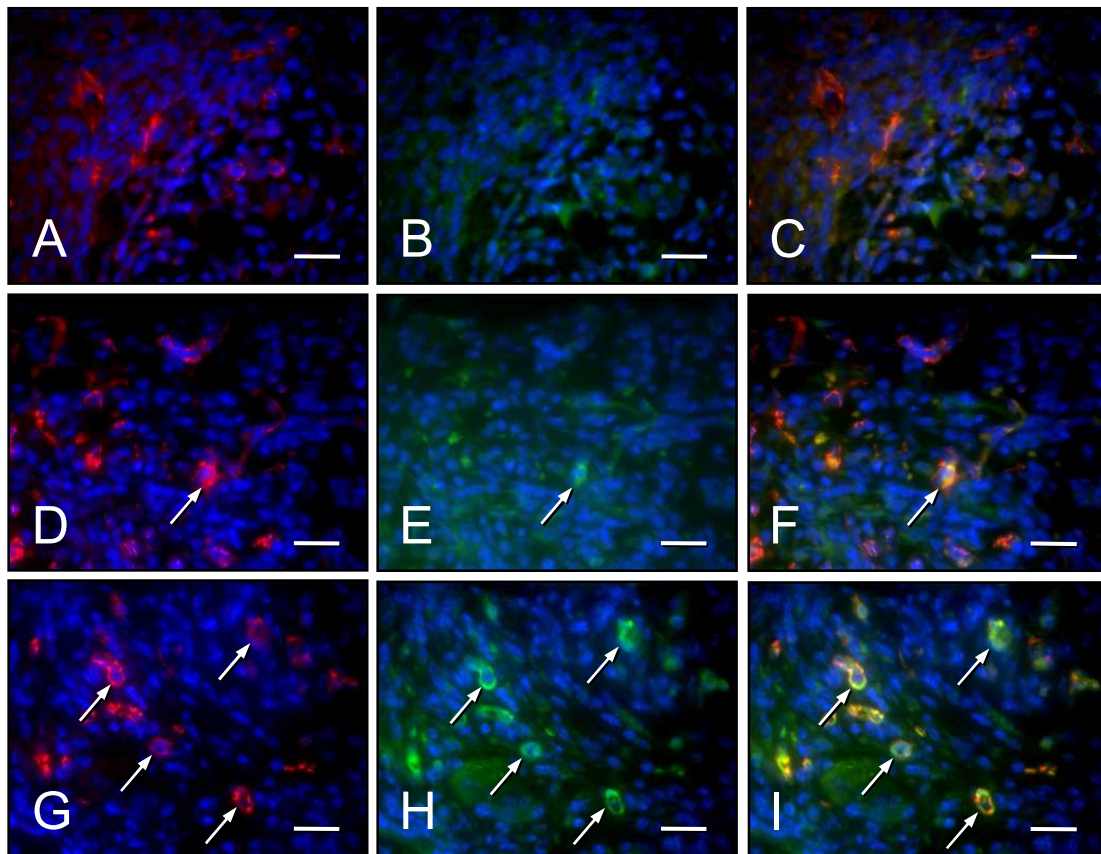


**Abbildung 21:** A-D: Intravitalmikroskopische Aufnahmen präformierter Blutgefäße im Zentrum eines Matrigel-freien Gewebekonstrukts nach Implantation in die Rückenhautkammer eines Empfängertieres. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten am Tag der Implantation des Konstrukts in die Rückenhautkammer (A) sowie am 6. (B), 10. (C) und 14. (D) Untersuchungstag. An den Tagen 0 und 6 stellen sich die beiden Gefäße noch schwarz dar (A, B, Pfeile). Eine vollständige Durchblutung ist an den Tagen 10 und 14 zu sehen (C, D, Pfeile). Diese Beobachtung beweist, dass die präformierten Gefäße im Gewebekonstrukt nach der Implantation in die Rückenhautkammer in der Lage sind, einen Anschluss an die Blutgefäße des Empfängers herzustellen. (intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran 5% in Blaulicht-Epi-Illumination; Sternchen = Scaffold; Maßstab: A-D = 100µm).



**Abbildung 22:** Reperfundierte Blutgefäße (%) von in situ prävascularisierten Gewebekonstrukten, die direkt aus der Flanke von Spendermäusen in die Rückenhautkammer implantiert wurden (weißer Balken) bzw. zuvor für 30min (grauer Balken) oder 3 Tage (schwarzer Balken) in Matrigel eingebettet waren. Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 3 innerhalb einer Gruppe; <sup>b</sup> $P < 0,05$  vs. Tag 3 und 6 innerhalb einer Gruppe; <sup>\*</sup> $P < 0,05$  vs. Kontrolle; <sup>#</sup> $P < 0,05$  vs. 30min Matrigel.





**Abbildung 23: A-I:** Immunhistochemische Färbungen der Blutgefäße im Randbereich von in situ prävascularisierten Gewebekonstrukten, die direkt aus der Flanke von Spendermäusen in die Rückenhautkammer implantiert wurden (A-C) bzw. zuvor für 30min (D-F) oder 3 Tage (G-I) in Matrigel eingebettet waren. Die Schnittpräparate wurden zur Darstellung der Zellkerne mit Bisbenzimid (A-I, blau), zum Nachweis mikrovaskulärer Endothelzellen mit einem CD31-Antikörper (A, D, G, rot) und zur Detektion GFP-positiver Endothelzellen mit einem GFP-Antikörper (B, E, H, grün) gefärbt. Abbildung C setzt sich zusammen aus A und B; F setzt sich zusammen aus D und E; I setzt sich zusammen aus G und H. Die für 3 Tage in Matrigel präkultivierten Gewebekonstrukte zeichnen sich im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen durch eine deutlich erhöhte Anzahl GFP-positiver Blutgefäße (Pfeile) im Randbereich aus (Maßstab: A-I = 26µm).

## 6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden experimentellen Arbeit konnte mit Hilfe des Modells der Rückenhautkammer in Kombination mit der Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die Inoskulation von in situ prävascularisierten Gewebekonstrukten untersucht werden. Dabei wurden die folgenden Ergebnisse erzielt:

1. Eine Kurzzeit-Kultivierung von in situ prävascularisierten Gewebekonstrukten führt zu ihrer beschleunigten Vaskularisierung nach Implantation in die Rückenhautkammer von Empfängertieren. Entsprechend ist die funktionelle Ka-

pillardichte dieser Konstrukte im Vergleich zu nicht kultivierten Kontrollen sowohl im Randbereich als auch im Zentrum zwischen den Tagen 6 und 14 erhöht. Außerdem weisen die für 3 Tage kultivierten Gewebekonstrukte verglichen mit der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung perfundierter Areale im Randbereich am 3. Tag nach Implantation auf.

2. Eine Kurzzeit-Kultivierung der Gewebekonstrukte für 3 Tage ist einer Langzeit-Kultivierung für 10 Tage vorzuziehen, denn die Apoptoserate der Zellen in den Gewebekonstrukten steigt mit längerer Kultivierungsdauer an. Des Weiteren führt die Kultivierung zu einer signifikanten Verringerung der Dichte von Blutgefäßen in den Gewebekonstrukten und zu einer Erniedrigung der Anzahl  $\alpha$ -SMA-positiver Gefäße. Dies zeigt, dass eine Kultivierung der Gewebekonstrukte zu einer Destabilisierung der in situ präformierten Blutgefäße führt.
3. Eine Präkultivierung in situ prävaskularisierter Gewebekonstrukte in Matrigel führt zu einem Auswachsen von Gefäßsprossen aus den Konstrukten in die umgebende extrazelluläre Matrix. Dies kann immunhistochemisch durch Endothelzellen nachgewiesen werden, die CD31 und GFP positiv sind.
4. Eine Präkultivierung in situ prävaskularisierter Gewebekonstrukte in Matrigel führt nach Implantation in die Rückenhautkammer zu einer verbesserten externen Inoskulation. Infolgedessen kommt es zu einer beschleunigten Reperfusion präformierter Gefäße und das hat wiederum eine gesteigerte funktionelle Kapillardichte der Konstrukte zur Folge.

## **7. Diskussion**

### **7.1. Diskussion von Material und Methodik**

#### **7.1.1. Diskussion des Modells**

Die Rückenhautkammer ist ein gut etabliertes Modell zur Analyse der Mikrozirkulation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. 1924 entwickelte SANDISON das erste „transparente“ Kammermodell an einem Kaninchenohr [SANDISON, 1924]. Mit diesem Modell konnte allerdings nur die Ausbildung von Granulationsgewebe mit ausgeprägter Neovaskularisierung im Rahmen eines Wundheilungsprozesses beobachtet werden. Ziel der heutigen Kammerpräparationstechniken ist die Darstellung der Mikrozirkulation unter physiologischen Bedingungen. Zum Erreichen dieses Ziels musste ein natürlich vorkommendes Körpergewebe genutzt werden, dessen Gefäßsystem weder durch die Implantation der Kammer noch durch das implantierte Material beeinträchtigt wird. Erstmalig gelang dies mit der Präparation von subkutanem Gewebe an der Rückenhautfalte von Ratten [YAMAURA et al., 1971; PAPENFUSS et al., 1979]. Inzwischen wurde das Modell der Rückenhautkammer weiterentwickelt und für die Ratte [HOBBS et al., 1976], den Hamster [ENDRICH et al., 1980] und die Maus [LEHR et al., 1993] etabliert.

Um die Mikrozirkulation in der Rückenhautkammer während des Versuchszeitraums nicht durch die vorangegangene Präparation der Kammer zu beeinflussen, erfolgt die Implantation der Kammer mindestens 48 Stunden vor Versuchsbeginn. Das chirurgische Trauma könnte zu einer arteriolären Konstriktion, zu einer Verminderung der nutritiven Perfusion oder zu einer inflammatorischen Antwort des Gewebes auf die mechanische Reizung führen. Durch den zeitlichen Abstand zwischen Präparation der Kammer und Versuchsbeginn werden diese möglichen Komplikationen minimiert. Weiterhin wird durch die Anfertigung der Kammerrahmen aus Titan die Belastung für die Versuchstiere reduziert, denn Titan zeichnet sich durch ein geringes Gewicht, eine hohe Stabilität sowie eine gute Biokompatibilität aus [MENGER et al., 1990].

Ein weiterer Vorteil des Modells der Rückenhautkammer besteht darin, dass das Deckglas der Kammer zu jedem beliebigen Zeitpunkt entfernt werden kann. Somit eignet sich das Modell besonders gut zur Untersuchung der entzündlichen und angiogenen Gewebereaktion auf implantierte Biomaterialien bzw. transplantierte Gewebe. Das freipräparierte Gewebe der Kammer ist durch die Titanrahmen und das Deckglas geschützt. Dadurch kommt es in der Regel auch nach mehreren Tagen nicht zu einer Austrocknung oder Entzündung des Kammergewebes.

Ein Nachteil der Rückenhautkammer ist das relativ kleine Beobachtungsfeld (Durchmesser 11mm), was die Größe der analysierbaren Biomaterialien begrenzt. Aus diesem Grund waren die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auf Gewebekonstrukte mit einer Fläche von 3 x 3mm und einer Dicke von 1mm beschränkt. Ein Nachteil der Rückenhautkammer der Maus im Vergleich zum Hamster ist die anspruchsvollere Präparation der Gewebeschichten. Beim Hamster sind die zu präparierenden Muskelschichten aufgrund geringerer intermuskulärer Gefäßverbindungen leichter abzulösen. Trotz der schwierigeren Präparation der Rückenhautkammer an der Maus bietet diese Spezies jedoch den großen Vorteil, dass sie genetisch sehr gut charakterisiert ist, so dass zahlreiche Antikörper für immunhistochemische Analysen zur Verfügung stehen [MENGER et al., 1993]. So wurden in der vorliegenden Arbeit beispielsweise GFP-positive transgene Mäuse verwendet, um immunhistochemisch zwischen den Blutgefäßen des Spenders und des Empfängers differenzieren zu können.

### **7.1.2. Diskussion der Untersuchungstechniken**

Für die Analyse der Mikrozirkulation stehen alternativ zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie verschiedene in vivo Methoden, wie beispielsweise die Mikrosphären-Technik [VOLLMAR et al., 1992], die Laser-Doppler-Flowmetrie [ARVIDSSON et al., 1988] oder die Elektronen-Spin-Resonanz-Messung [KUNZ et al., 1991; CONNOR et al., 1992] zur Verfügung. Sie lassen jedoch nur indirekte Aussagen über die Mikrozirkulation zu. Durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit der Epi-Illuminationstechnik ist eine direkte Visualisierung des Gefäßsystems auch nicht transilluminierbarer Organe möglich. In der vorliegenden Arbeit konnten damit sowohl sämtliche Gefäßabschnitte der Rückenhautkammerpräparation, bestehend aus terminalen Arteriolen, Kapillaren, postkapillaren Venolen und Sammelvenolen, als auch

die sich entwickelnden mikrovaskulären Netzwerke sowie die Reperfusion präformierter Gefäße in den implantierten Gewebekonstrukten dargestellt werden. Mit entsprechenden Bildverarbeitungstechniken [INTAGLIETTA und TOMPKINS 1972b; PRIES, 1988; KLYSCZ et al., 1997] können die auf DVD aufgezeichneten mikroskopischen Bilder am Ende des Versuchs ohne weitere Belastung für das Versuchstier quantitativ ausgewertet werden. Dabei ist es möglich, durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe bestimmte zelluläre und molekulare Prozesse zu analysieren. Hierzu zählen das Fließverhalten von Leukozyten und Thrombozyten [MENGER et al., 1992b], Veränderungen der Gefäßpermeabilität [PRIES, 1988] sowie verschiedene Mechanismen des Zelltods wie Apoptose [WESTERMANN et al., 1999] und Nekrose [HARRIS et al., 1997].

In der vorliegenden Arbeit wurde zu Beginn jeder intravitalmikroskopischen Untersuchung der Farbstoff FITC-Dextran 5% intravenös injiziert. Durch diesen Farbstoff wird das Blutplasma angefärbt und die Gefäße können in Blaulicht-Epi-Illumination dargestellt werden. Durch den Einsatz dieses Fluoreszenzfarbstoffs sind phototoxische Effekte möglich. Dabei können die verwendeten Fluorochrome dazu angeregt werden, freie Sauerstoffradikale zu bilden, die potentiell in der Lage sind, das Gewebe der Kammerpräparation zu schädigen. Weiterhin kann eine lange Untersuchungszeit der Kammer unter dem Mikroskop zur Überwärmung des Gewebes mit Bildung freier Sauerstoffradikale führen. Mögliche Auswirkungen dieser Radikale auf die Mikrozirkulation sind eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung [ROSENBLUM, 1978; HERRMANN, 1983], Endothelzellschäden [REED und MILLER, 1988], Vasospasmen [SAETZLER et al., 1997] und eine Reduktion der funktionellen Kapillardichte [FRIESENECKER et al., 1994]. Zur Minimierung dieser phototoxischen Effekte wurde in der vorliegenden Studie eine niedrige Dosierung des Fluoreszenzfarbstoffs gewählt und die Beobachtungszeit auf 15-20 Minuten pro Versuchstier und Untersuchungszeitpunkt beschränkt.

## **7.2. Diskussion der Ergebnisse**

### **7.2.1. Inoskulation von Gewebekonstrukten nach in situ Prävascularisierung und Kultivierung in DMEM**

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Prozess der Inoskulation prävascularisierter Gewebekonstrukte entscheidend von der Reife der präformierten Gefäßnetzwerke abhängig ist. So sind destabilisierte Blutgefäße ohne perivaskuläre glatte Muskulatur in der Lage, sich schneller mit den Gefäßen des Empfängergewebes zu verbinden. Da eine adäquate Blutversorgung sowohl für das Überleben als auch die Langzeitfunktion implantierter Gewebekonstrukte essentiell ist [LASCHKE et al., 2006; LOKMIC und MITCHELL, 2008], kann dieses Ergebnis zum zukünftigen Erfolg des Tissue Engineerings beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden in situ prävascularisierte Gewebekonstrukte für 3 bzw. 10 Tage in DMEM kultiviert und anschließend in die Rückenhautkammer von Empfängertieren implantiert. Entsprechend der Studie von SHEPHERD et al. [2004] führte die Kultivierung der Konstrukte zu einer Destabilisierung der präformierten Gefäßnetzwerke. Dies konnte durch eine signifikante Reduktion des Anteils der Blutgefäße mit  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen im Vergleich zu nicht kultivierten Konstrukten nachgewiesen werden.

Weiterhin induzierte die Kultivierung eine Regression präformierter Gefäße mit der Folge einer erniedrigten Gefäßdichte in den Konstrukten. Diese Beobachtung könnte auf der fehlenden Durchblutung der präformierten Gefäßnetzwerke während des Kultivierungszeitraums beruhen. So wirken infolge des fehlenden Blutflusses keine intravaskulären mechanischen Kräfte. Diese Kräfte spielen jedoch eine wichtige Rolle bei der Proliferation und dem Überleben von Endothelzellen [KADOHAMA et al., 2007]. Aufgrund des fehlenden Blutflusses sterben die Endothelzellen ab und infolgedessen kommt es zum Untergang der Blutgefäße [BALUK et al., 2004]. Andererseits kann die Trennung der Perizyten von der Gefäßwand während des Kultivierungszeitraums die Anfälligkeit der Endothelzellen für einen apoptotischen Zelluntergang erhöhen [BENJAMIN et al., 1998; BERGERS und SONG, 2005]. Interessanterweise wurden jedoch keine Unterschiede bezüglich Gefäßdichte und -reife der prävascularisierten Gewebekonstrukte nach dreitägiger bzw. zehntägiger Kultivierung gefunden. Dennoch wiesen die für 10 Tage kultivierten Gewebekonstrukte nach Implantation in die

Rückenhautkammer entscheidend weniger perfundierte Blutgefäße auf. Ursächlich dafür ist wahrscheinlich der hohe Anteil apoptotischer Zellen in den für 10 Tage kultivierten Konstrukten. Deswegen sollte zur Modifikation der Gefäßreife präformierter Blutgefäße eine Kurzzeit-Kultivierung bevorzugt werden. Diese führt offensichtlich nicht zu einem erhöhten Zelltod in den in situ generierten prävascularisierten Gewebekonstrukten vor Implantation in den Empfänger.

Zur Untersuchung des Prozesses der Inoskulation wurden prävascularisierte Gewebekonstrukte mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie über einen Versuchszeitraum von 14 Tagen in Rückenhautkammern analysiert. Für eine erfolgreiche Inoskulation müssen Gefäßsprossen sowohl aus den präformierten Gefäßen der Konstrukte als auch aus den Blutgefäßen des Empfängers auswachsen, die sich schließlich miteinander verbinden [TREMBLAY et al., 2005; LASCHKE et al., 2009]. Eine Destabilisierung der Blutgefäße beschleunigt dabei die Bildung von Gefäßsprossen, da die Migration von Endothelzellen ins Interstitium erleichtert wird. Diese Destabilisierung präformierter Blutgefäße trat bereits bei der Kultivierungsdauer von 3 Tagen auf und könnte dadurch die Bildung von Gefäßsprossen nach Implantation der Gewebekonstrukte in das Empfängergewebe begünstigt haben.

Bei dem Prozess der Inoskulation wird zwischen einer externen und einer internen Inoskulation unterschieden. Durch Implantation prävascularisierter Gewebekonstrukte aus FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäusen in Rückenhautkammern von Wildtyp FVB/N Mäusen wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die beiden Prozesse sich nicht gegenseitig ausschließen, sondern parallel auftreten. So wurden sowohl GFP-negative Blutgefäße im Zentrum der Gewebekonstrukte als auch GFP-positive Blutgefäße im umgebenden Empfängergewebe nachgewiesen.

Die beschleunigte Inoskulation der für 3 Tage kultivierten Gewebekonstrukte ging im Vergleich zu den Konstrukten der beiden anderen Gruppen mit einer verbesserten Vaskularisierung nach Implantation einher. Weiterhin wiesen die kurzzeitig kultivierten Gewebekonstrukte im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich weniger präformierte Blutgefäße vor der Implantation in die Rückenhautkammer auf. Dennoch war in dieser Gruppe zwischen den Tagen 6 und 14 die funktionelle Kapillardichte deutlich erhöht. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass eine dreitägige Kultivierung der Konstrukte deren Blutversorgung nach Implantation nicht nur durch eine beschleunigte Reperfusion präformierter Blutgefäße verbessert, sondern zusätzlich eine ver-

stärkte Stimulation der Angiogenese bewirkt, beispielsweise durch frühzeitig migrierende Endothelzellen. Dies kann einerseits durch die Destabilisierung der Blutgefäße während des Kultivierungszeitraums erklärt werden. Andererseits könnte es aufgrund der früheren Durchblutung der Gewebekonstrukte zu einer Scherstress-induzierten Neubildung von Blutgefäßen gekommen sein. So ist Scherstress ebenfalls ein wichtiger Trigger für die Ausbildung neuer Blutgefäße [BROWN und HUDLIKA, 2003; RESNICK et al., 2003]. Entsprechend waren die Blutgefäße dieser Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen durch eine erhöhte Blutzellgeschwindigkeit, einen erhöhten Blutvolumenfluss und eine erhöhte Scherrate gekennzeichnet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Kurzzeit-Kultivierung von in situ prävascularisierten Gewebekonstrukten die Inoskulation ihrer Gefäßnetzwerke mit den Blutgefäßen des Empfängergewebes beschleunigt. Dies beruht wohl auf einer Destabilisierung der präformierten Blutgefäße.

### **7.2.2. Inoskulation von Gewebekonstrukten nach in situ Prävascularisierung und Einbettung in Matrigel**

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Prozess der Inoskulation durch eine Präkultivierung prävascularisierter Gewebekonstrukte in einer pro-angiogenen extrazellulären Matrix vor Implantation beschleunigt werden kann.

Zur Kultivierung der in situ generierten Gewebekonstrukte wurde Matrigel verwendet, das verschiedene pro-angiogene Wachstumsfaktoren enthält und die Bildung neuer Blutgefäße fördert. Matrigel wird seit vielen Jahren in verschiedenen in vitro Assays zur Identifizierung von Inhibitoren und Stimulatoren der Angiogenese verwendet [KLEINMAN und MARTIN, 2005]. Weiterhin konnte durch Inkorporation von Matrigel in Scaffolds deren Vaskularisierung nach Implantation verbessert werden [LASCHKE et al., 2008; STRIETH et al., 2010]. Da Matrigel aus einem schlecht differenzierten Chondrosarkom der Maus gewonnen wird, kann es im klinischen Alltag nicht zur Kultivierung von Gewebekonstrukten angewendet werden. Seine pro-angiogene Aktivität ist jedoch bereits sehr gut erforscht und es wurde deswegen in den vorliegenden Experimenten als standardisierte extrazelluläre Matrix verwendet.

Während der dreitägigen Kultivierung prävascularisierter Gewebekonstrukte in Matrigel kam es zum Auswachsen von Gefäßsprossen aus den präformierten Gefäßen.



Infolgedessen konnten in dem das Gewebekonstrukt umgebenden Matrigel CD31/GFP-positive Endothelzellen nachgewiesen werden. Am 3. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer des Empfängertieres konnten starke Einblutungen im Randbereich der Gewebekonstrukte beobachtet werden, die eventuell durch Mikroblutungen der fragilen präformierten Gefäßsprossen verursacht wurden. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die Gewebekonstrukte, die für 3 Tage in Matrigel präkultiviert wurden, im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen wesentlich mehr GFP-positive Blutgefäße in ihrem Randbereich aufwiesen. Entsprechend kann geschlussfolgert werden, dass in dieser Gruppe eine vermehrte externe Inoskulation der präformierten Blutgefäße stattfand.

Zusätzlich waren die für 3 Tage in Matrigel eingebetteten prävaskularisierten Gewebekonstrukte im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen durch eine signifikant erhöhte funktionelle Kapillardichte im Randbereich und im Zentrum gekennzeichnet. Ursächlich dafür könnte die frühere Reperfusion der präformierten Blutgefäße sein. Zudem könnte alleine schon die pro-angiogene Aktivität des Matrigels für die höhere funktionelle Kapillardichte verantwortlich sein. Zum Ausschluss dieser Hypothese wurden prävaskularisierte Gewebekonstrukte für 30min in Matrigel eingebettet. Diese wiesen jedoch keine erhöhte funktionelle Kapillardichte nach Implantation auf, so dass die alleinige pro-angiogene Aktivität des Matrigels nicht für die verstärkte Vaskularisierung verantwortlich gemacht werden kann. Zudem besaßen die in Matrigel eingebetteten Gewebekonstrukte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant höhere Blutzellgeschwindigkeit am 10. Untersuchungstag. Diese kann durch eine frühere Reperfusion präformierter Blutgefäße nach Implantation erklärt werden.

Die Gefäßdurchmesser in den Konstrukten der beiden Matrigelgruppen wurden kontinuierlich kleiner, wohingegen die Durchmesser der Gefäße in den Konstrukten der Kontrollgruppe über den Versuchszeitraum von 14 Tagen nahezu konstant blieben. Dieser Befund lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass Matrigel nicht nur pro-angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF [YANCOPOULOS et al., 2000], IGF-1 [BECKERT et al., 2006] und EGF [VANCRAIJSSEN et al., 2005] enthält, sondern zusätzlich durch PDGF [JAIN, 2003] und TGF- $\beta$  [RICHARDSON et al., 2001] auch eine nachträgliche Reifung der neugebildeten Blutgefäße stimulieren kann. Diese Gefäßreife entsteht durch Rekrutierung perivaskulärer glatter Muskelzellen. Typischerweise ist dieser Vorgang durch eine Verringerung der Blutgefäßdurchmesser charakterisiert [LASCHKE et al., 2002; GERHARDT und BETSHOLTZ, 2003]. Die erniedrigten Ge-

fäßdurchmesser im Zusammenhang mit den frühzeitig auftretenden hohen Blutzellgeschwindigkeiten in den Gefäßen der in Matrigel präkultivierten Gewebekonstrukte könnten aufgrund der dadurch erzeugten Scherspannung ebenfalls zu der verstärkten Angiogenese in den Konstrukten beigetragen haben [BROWN und HUDLIKA, 2003; RESNICK et al., 2003].

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die Durchblutung prävaskularisierter Gewebekonstrukte durch Präkultivierung in einer pro-angiogenen extrazellulären Matrix beschleunigt werden kann. Diese Präkultivierung fördert die externe Inoskulation der präformierten Gefäßnetzwerke.

### 7.3. Schlussfolgerung

Eines der Hauptprobleme beim klinischen Einsatz des Tissue Engineerings stellt die fehlende oder unzureichende Vaskularisierung von Gewebekonstrukten nach Implantation in ein Empfängergewebe dar. Mit Hilfe der in vitro oder in situ Generierung von Gefäßnetzwerken in Gewebekonstrukten wird eine erfolgsversprechende Möglichkeit geschaffen, eine schnellere lebenserhaltende Blutversorgung der Implantate durch den Prozess der Inoskulation zu erzielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig in vivo die Inoskulation prävaskularisierter Gewebekonstrukte mit Hilfe transgener Mausmodelle und intravitaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass durch Kurzzeit-Kultivierung der prävaskularisierten Gewebekonstrukte eine Destabilisierung der in situ präformierten Blutgefäße erfolgt, was nach der Implantation in das Empfängergewebe den Prozess der Inoskulation beschleunigt. Des Weiteren wurde der Nachweis erbracht, dass durch Präkultivierung in situ prävaskularisierter Gewebekonstrukte in einer pro-angiogenen extrazellulären Matrix vor Implantation das Auswachsen von Gefäßsprossen aus den präformierten Gefäßen gefördert werden kann. Dies führt nach Implantation der Konstrukte in das Empfängergewebe zu einer verbesserten externen Inoskulation.

Es kann daher geschlussfolgert werden, dass mit den beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Strategien das Überleben von Zellen in dreidimensionalen Gewebekonstrukten zukünftig verbessert und damit die Erfolgsrate verschiedener Tissue Engineering-Verfahren maßgeblich gesteigert werden kann.

## 8. Literatur

1. **Agrawal CM, Ray RB** (2001) Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Biomed Mater Res* 55: 141-150
2. **Algire GH** (1943) An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4: 1-11
3. **Arvidsson D, Svensson H, Haglund U** (1988) Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. *Am J Physiol* 254: 471-476
4. **Baker M, Wayland H** (1974) On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 7: 131-143
5. **Baluk P, Lee CG, Link H, Ator E, Haskell A, Elias JA, McDonald DM** (2004) Regulated angiogenesis and vascular regression in mice overexpressing vascular endothelial growth factor in airways. *Am J Pathol* 165: 1071-1085
6. **Beckert S, Farrahi F, Perveen Ghani Q, Aslam R, Scheuenstuhl H, Coerper S, Königsrainer A, Hunt TK, Hussain MZ** (2006) IGF-I-induced VEGF expression in HUVEC involves phosphorylation and inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 67-72
7. **Benjamin LE, Hemo I, Keshet E** (1998) A plasticity window for blood vessel remodeling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125: 1591-1598
8. **Bergers G, Song S** (2005) The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 7: 452-464
9. **Boissard CI, Bourban PE, Tami AE, Alini M, Eglin D** (2009) Nanohydroxyapatite/poly(ester-urethane) scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 5: 3316-3327
10. **Borges J, Tegtmeier FT, Torio-Padron N, Mueller MC, Stark GB** (2004) Untersuchung der Angiogenese im Tissue Engineering: Das Zylindermodell auf der Chorioallantoismembran. *Chirurg* 75: 284-290
11. **Brown MD, Hudlicka O** (2003) Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis* 6: 1-14
12. **Colton CK** (1995) Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant* 4: 415-436
13. **Connor HD, Gao W, Nukina S, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG** (1992) Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat - an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation* 54: 199-204

14. **Deasy BM, Liy, Huard J** (2004) Tissue engineering with muscle-derived stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 15: 419-423
15. **Druecke D, Langer S, Lamme E, Pieper J, Ugarkovic M, Steinau HU, Homann HH** (2004) Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: Long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J Biomed Mater Res A* 68: 10-18
16. **Ducheyne P, Qiu Q** (1999) Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20: 2287-2303
17. **Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K** (1980) Technical report - a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med* 117: 125-134
18. **Ennett AB, Kaigler D, Mooney DJ** (2006) Temporally regulated delivery of VEGF in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A* 79: 176-184
19. **Freyman TM, Yannas IV, Yokoo R, Gibson LJ** (2001) Fibroblast contraction of a collagen GAG-matrix. *Biomaterials* 22: 2883-2891
20. **Friesenecker B, Tsai AG, Instaglietta M** (1994) Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle. *Am J Physiol* 267: 2204-2212
21. **Folkmann J, Hocherg M** (1973) Self-regulation of growth in three dimensions. *Exp Med* 138: 745-753
22. **Gerhardt H, Betsholtz C** (2003) Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 314: 15-23
23. **Gorna K, Gogolewski S** (2006) Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. *J Biomed Mater Res A* 79: 128-138
24. **Harris AG, Hecht R, Peer F, Nolte D, Messmer K** (1997) An improved intravital microscopy system. *Int J Microcirc Clin Exp* 17: 322-327
25. **Herrmann KS** (1983) Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res* 26: 238-249
26. **Hobbs JB, Chusilp S, Hua a, Kincaid-Smith B, McIver MA** (1976) The pathogenesis of hypertensive vascular changes in the rat: microscopic and ultrastructural correlation in vivo. *Clin Sci Mol Med* 51: 73-75
27. **Holland TA, Bodde EW, Baggett LS, Tabata Y, Mikos AG, Jansen JA** (2005) Osteochondral repair in the rabbit model utilizing bilayered degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 75: 156-167

28. **Intaglietta M, Tompkins WR** (1972) On-line measurement of microvascular dimensions by television microscopy. *J Appl Physiol* 32: 546-551
29. **Isaji M, Miyata H, Ajisawa Y, Takehana Y, Yoshimura N** (1997) Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo. *Br J Pharmacol* 122: 1061-1066
30. **Jain RK** (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9: 685-693
31. **Jiang J, Kojima N, Guo L, Naruse K, Makuuchi M, Miyajima A, Yan W, Sakaiy** (2004) Efficacy of engineered liver tissue based on poly-L-lactic acid scaffolds and fetal mouse liver cells cultured with oncostatin M, nicotinamide, and dimethyl sulfoxide. *Tissue Eng* 10: 1577-1586
32. **Kadohama T, Nishimura K, Hoshino Y, Sasajima T, Sumpio BE** (2007) Effects of different types of fluid shear stress on endothelial cell proliferation and survival. *J Cell Physiol* 212: 244-251
33. **Kisucka J, Butterfield CE, Duda DG, Eichenberger SC, Saffaripour S, Ware J, Ruggeri ZM, Jain RK, Folkman J, Wagner DD** (2006) Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 855-860
34. **Kleinman HK, Martin GR** (2005) Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 15: 378-386
35. **Klyszcz T, Junger M, Jung F, Zeintl H** (1997) Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech* 42: 168-175
36. **Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, Jain RK** (2004) Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature* 428: 138-139
37. **Kokemueller H, Spalthoff S, Nolff M, Tavassol F, Essig H, Stuehmer C, Bormann KH, Rücker M, Gellrich NC** (2010) Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39: 379-387
38. **Kremer M, Lang E, Berger AC** (2000) Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix (Integra artificial skin). *Plast Surg* 53: 459-465
39. **Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ** (1988) Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107: 1589-1598
40. **Kunz R, Brune HA, Ziegler U, Marzinzig M, Beger HG** (1991) Ischemia/reperfusion damage of the liver caused by free radicals - direct radical detection using electron spin resonance (ESR). *Langenbecks Arch Chir* 376: 139-142

41. **Laschke MW, Menger MD, Vollmar B** (2002) Ovariectomy improves neovascularization and microcirculation of freely transplanted ovarian follicles. *J Endocrinol* 172: 535-544
42. **Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rücker M, Junker D, Häufel JM, Carvalho C, Heberer M, Germann G, Vollmar B, Menger MD** (2006) Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 12: 2093-2104
43. **Laschke MW, Rücker M, Jensen G, Carvalho C, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD** (2008) Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature. *Ann Surg* 248: 939-948
44. **Laschke MW, Strohe A, Scheuer C, Eglin D, Verrier S, Alini M, et al** (2009) In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomater* 5: 1991-2001
45. **Laschke MW, Mussawy H, Schuler S, Eglin D, Alini M, Menger MD** (2010) Promoting external inosculation of prevascularized tissue constructs by pre-cultivation in an angiogenic extracellular matrix. *Eur Cell Mater* 20: 356-366
46. **Lees JG, Lim SA, Croll T, Williams G, Lui S, Cooper-White J, McQuade LR, Mathiyalagan B, Tuch BE** (2007) Transplantation of 3D scaffolds seeded with human embryonic stem cells: biological features of surrogate tissue and teratoma-forming potential. *Regen Med* 2: 289-300
47. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K** (1993) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143: 1055-1062
48. **Lokmic Z, Mitchell GM** (2008) Engineering the microcirculation. *Tissue Eng Part B Rev* 14: 87-103
49. **Loughna S, Sato TN** (2001) Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development. *Matrix Biol* 20: 319-325
50. **Lundborg G** (2004) Alternatives to autologous nerve grafts. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 36: 1-7
51. **Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, Holthaus KA, Hopfer H, Chandamuri BR, Kharbanda S, Kalluri R** (2001) Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem* 276: 15240-15248
52. **Marijnissen WJ, Van Osch GJ, Aigner J, Van Der Veen SW, Hollander AP, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA** (2002) Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 23: 1511-1517

53. **Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichell F, Crovace A, Cancedda R** (2005) Tissue engineering of bone: Search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res* 8: 277-284
54. **Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K** (1990) Neovascularization of prosthetic vascular grafts: quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg* 38: 139-145
55. **Menger MD, Laschke MW, Vollmar B** (2002) Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34: 83-91
56. **Menger MD, Lehr HA** (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14: 519-522
57. **Motoike T, Loughna S, Perens E, Roman BL, Liao W, Chau TC, Richardson CD, Kawate T, Kuno J, Weinstein BM, Stainier DY, Sato TN** (2000) Universal GFP reporter for the study of vascular development. *Genesis* 28: 75-81
58. **Nillesen ST, Geutjes PJ, Wismans R, Schalkwijk J, Daamen WF, van Kuppevelt TH** (2007) Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials* 28: 1123-1131
59. **Norrby K** (1997) Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS* 105: 417
60. **Ohashi K, Waugh JM, Dake MD, Yokoyama T, Kuge H, Nakajima Y, Yamanouchi M, Naka H, Yoshioka A, Kay MA** (2005) Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology* 41: 132-140
61. **Orr AW, Elzie CA, Kucik DF, Murphy-Ullrich JE** (2003) Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci* 116: 2917-2927
62. **Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA** (1979) A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18: 311-318
63. **Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS, Martin GR** (1992) A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 67: 519-528
64. **Patan S** (2004) Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 117: 3
65. **Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S** (2003) Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A* 65: 489-497

66. **Pries AR** (1988) A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc: Clin Exp* 7: 327-345
67. **Reed MW, Miller FN** (1988) Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc Res* 36: 104-107
68. **Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, Shushy M, Schubert S, Zilberman LC, Wofovitz E** (2003) Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol* 81: 177-199
69. **Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ** (2001) Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 19: 1029-1034
70. **Rosenblum WI** (1978) Fluorescence induced in platelet aggregates as a guide to luminal contours in the presence of platelet aggregation. *Microvasc Res* 15: 103-106
71. **Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Schramm A, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD** (2006) Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials* 27: 5027- 5038
72. **Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF** (1997) Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45: 505-513
73. **Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL** (2004) Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromol Biosci* 4: 743-765
74. **Sandison JC** (1924) A new method for the microscopic study of living growing tissues by introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat Rec* 28: 281-287
75. **Schlingemann RO, Rietveld FJ, Kwaspen F, van de Kerkhof PC, de Waal RM, Ruiter DJ** (1991) Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. *Am J Pathol* 138: 1335-1347
76. **Shepherd BR, Chen HY, Smith CM, Gruionu G, Williams SK, Hoying JB** (2004) Rapid perfusion and network remodeling in a microvascular construct after implantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 898-904
77. **Shepherd BR, Enis DR, Wang F, Suarez Y, Pober JS, Schechner JS** (2006) Vascularization and engraftment of a human skin substitute using circulating progenitor cell-derived endothelial cells. *FASEB J* 20: 1739-1741
78. **Smiler D, Soltan M, Lee JW** (2007) A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. *Implant Dent* 16: 42-53
79. **Soltysiak P, Saxena AK** (2009) Micro-computed tomography for implantation site imaging during in situ oesophagus tissue engineering in a live small animal model. *J Tissue Eng Regen Med* 3: 573-576



80. **Strieth S, Weger T, Bartesch C, Bittmann P, Stelter K, Berghaus A** (2010) Bio-compatibility of porous polyethylene implants tissue-engineered by extracellular matrix and VEGF. *J Biomed Mater Res A* 93: 1566-1573
81. **Sung HJ, Meredith C, Johnson C, Galis ZS** (2004) The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* 25: 5735-5742
82. **Tremblay PL, Hudon V, Berthod F, Germain L, Auger FA** (2005) Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant* 5: 1002-1010
83. **Vacanti CA, Upton J** (1994) Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plast Surg* 21: 445-462
84. **Van Cruijssen H, Giaccone G, Hoekman K** (2005) Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies. *Int J Cancer* 117: 883-888
85. **Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K** (1992) Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg* 75: 421-430
86. **Warren BA, Shubik P, Wilson R, Garcia H, Feldman R** (1978) The microcirculation in two transplantable melanomas of the hamster. In vivo observations in transparent chambers. *Cancer Lett* 4: 109-116
87. **Westermann GW, Böhm M, Bonsmann G, Rahn KH, Kisters K** (1999) Chronic intoxication by doxycycline use for more than 12 years. *J Intern Med* 246: 591-592
88. **Yamura H, Suzuki M, Sato H** (1971) Transparent chamber in the rat skin for studies on microcirculation in cancer tissue. *Gann* 62: 177-181
89. **Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J** (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248
90. **Yarlagadda PK, Chandrasekharan M, Shyan JY** (2005) Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed Mater Eng* 15: 159-177
91. **Zarem HA** (1969) The microcirculatory events within full-thickness skin allografts (homografts) in mice. *Surgery* 66: 392-397

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Dissertation tatkräftig zur Seite standen.

Herrn Professor Dr. Michael D. Menger für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes tätig sein zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Matthias W. Laschke für die persönliche Einarbeitung in die Thematik, die hervorragende fachliche Betreuung sowie die jederzeit möglichen Besprechungen. Ohne sein stetiges Engagement wäre ein Erfolg dieser Arbeit unvorstellbar gewesen.

Frau Elisabeth Gluding, Frau Janine Becker und Frau Sandra Schuler für ihre Unterstützung bei den Laborarbeiten und der Erstellung von histologischen Präparaten. Sie haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Nicht zuletzt danke ich all denen, die mich durch interessierte Diskussionen und persönliche Anteilnahme bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Haider Mussawy

## 10. Publikationen

### Originalarbeiten:

Laschke MW, **Mussawy H**, Schuler S, Eglin D, Alini M, Menger MD (2010) Promoting external inosculation of prevascularized tissue constructs by pre-cultivation in an angiogenic extracellular matrix. Eur Cell Mater 20: 356-366

Laschke MW, **Mussawy H**, Schuler S, Kazakov A, Rücker M, Eglin D, Alini M, Menger MD (2011) Short-term cultivation of in situ prevascularized tissue constructs accelerates inosculation of their preformed microvascular networks after implantation into the host tissue. Tissue Eng Part A 17: 841-853

### Kongressbeiträge:

**Mussawy H**, Laschke MW, Schuler S, Eglin D, Alini M, Menger MD (2011) Verbesserung externer Inoskulation prävascularisierter Gewebekonstrukte durch Kultivierung in einer pro-angiogenen extrazellulären Matrix. Langenbecks Arch Surg 396: 555